

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Fyzikální chemie



FYZIOLOGICKÝ
ÚSTAV AV ČR

Mgr. Salome Kylarová

STUDIUM MOLEKULÁRNÍCH MECHANISMŮ REGULACE SIGNÁLNÍCH PROTEINŮ

Study of molecular mechanisms of the signaling proteins regulation

Disertační práce

Školitel: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 7.5. 2018

.....

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. za odborné vedení disertační práce, její laskavý přístup a cenné rady, které mi v průběhu jejího zpracování poskytla.

Zvláštní poděkování patří prof. RNDr. Tomáši Obšilovi, Ph.D. za veškeré konzultace, které mi ohledně mého projektu poskytl.

Rovněž děkuji celému kolektivu Laboratoře biofyzikální chemie a Laboratoře Strukturní biologie signálních proteinů za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Dále děkuji RNDr. Petru Pompachovi Ph.D. a RNDr. Petru Manovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR za jejich odbornou spolupráci při měření a zpracování dat z hmotnostní spektrometrie, vodík/deuteriové výměny a chemického zesíťování.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Jaroslavu Večeřovi, CSc., a prof. RNDr. Petru Heřmanovi, CSc. z Fyzikálního ústavu MFF UK za měření a vyhodnocení dat z časově-rozlišené fluorescenční spektroskopie.

Na závěr nesmím opomenout poděkovat svým nejbližším a přátelům, kteří mi byli oporou v průběhu celého studia.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře Grantové agentury České republiky (Projekt č. 14-10061S, 16-02739S) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (Projekt č. 161116)

Tato práce byla vypracována na oddělení Strukturní biologie signálních proteinů Fyziologického ústavu AV ČR. Práce je z největší části založena na následujících publikacích, jejichž kopie jsou součástí přílohy:

D. Kosek⁺, **S. Kylarova**⁺, K. Psenakova, L. Rezabkova, P. Herman, J. Vecer, V. Obsilova, T. Obsil „Biophysical nad Structural Characterization of the Thioredoxin-Binding domain of Protein Kinase ASK1 and its Interaction with Reduced Thioredoxin.“ *Journal of Biological Chemistry* 279, 24463-24474 (2014) (IF = 4.573, Q1)

S. Kylarova⁺, D. Kosek⁺, O. Petrvalska, K. Psenakova, P. Man, J. Vecer, P. Herman, V. Obsilova, T. Obsil „Cysteine residues mediate high-affinity binding of thioredoxin to ASK1.“ *FEBS Journal* 283, 3821-3838 (2016) (IF = 4.237, Q1)

K. Psenakova⁺, O. Petrvalska⁺, **S. Kylarova**⁺, D. Lentini Santo, D. Kalabova, P. Herman, V. Obsilova, T. Obsil V. Obsilova, T. Obsil „14-3-3 protein directly interacts with the kinase domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK2).“ *Biochimica et Biophysica Acta*. Přijato k tisku. (2018)
<doi:10.1016/j.bbagen.2018.04.006. > (IF = 4.702)

⁺ rovnocenní první autoři

S. Kylarova, K. Psenakova, P. Herman, V. Obsilova, T. Obsil „CaMKK2 kinase domain interacts with the autoinhibitory region through the N-terminal lobe including the RP insert.“ V recenzním řízení.

Další publikace autora:

V. Obsilova, M. Kopecka, D. Kosek, M. Kacirova, **S. Kylarova**, L. Rezabkova, T. Obsil „Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation.“ *Physiological Research* 63 Suppl 1, 155-164 (2014), IF = 1.293

Abstrakt CZ

Předložená práce se zabývá studiem regulačních mechanismů dvou důležitých signálních proteinkinas a slibných cílů terapeutického zásahu, ASK1 a CaMKK2. Proteinkinasa ASK1 je důležitým členem MAP3K proteinkinasové rodiny. Pod vlivem různých stresových podnětů jako je oxidativní stres se ASK1 spolupodílí na iniciaci signální kaskády, která vede k aktivaci MAP kinas JNK a p38. Funkce ASK1 je spojována s apoptosou a proto je její regulace klíčová v patogenezi mnoha onemocnění včetně rakoviny, neurodegenerace a kardiovaskulárních chorob. Mezi přirozené inhibitory její funkce patří thioredoxin, univerzální oxidoreduktasa, která se váže na N-konec ASK1, kde pravděpodobně brání její oligomerizaci a následné aktivaci. Předpokládá se, že při oxidativním stresu thioredoxin disociuje na základě oxidace cysteinů v aktivním centru, ale strukturní podstata této interakce nebyla doposud objasněna.

CaMKK2 se řadí mezi přední zástupce CaM kinas, která skrze aktivaci CaMKI, CaMKIV a AMPK reguluje genovou expresi nebo apoptosu. Funkce tohoto proteinu je spojována s vývojem neurologických poruch, rakoviny nebo obezity. Všechny CaM kiny jsou aktivovány vazbou Ca^{2+} /kalmodulinu. Ze strukturních studií různých CaM kinas je patrné, že CaMKK2 obsahuje neobvyklé strukturní prvky, naznačující odlišný aktivační mechanismus. CaMKK2 je dále regulována prostřednictvím fosforylace na různých místech molekuly. Dvě fosforylační místa, Ser¹⁰⁰ a Ser⁵¹¹, byly identifikovány jako možné vazebné motivy pro proteiny 14-3-3. Tyto všestranné dimerní proteiny regulují fosforylované substráty na základě změny jejich konformace nebo změny dostupnosti důležitých signálních sekvencí. Úloha těchto proteinů v regulaci CaMKK2 však stále není dostatečně prozkoumána.

Biofyzikální a strukturní charakterizace komplexů těchto proteinkinas s jejich interakčními partnery nám umožnila popsat vazebné povrchy, stanovit vazebné afinity, stechiometrie a dynamiku příslušných komplexů a tím přispět k objasnění studovaných mechanismů.

Abstract EN

The aim of this study was to investigate the regulatory mechanisms of two important signaling protein kinases and promising therapeutic targets, ASK1 and CaMKK2. ASK1 kinase is a member of the mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K) family that activates c-JNK kinase and p38 MAP kinase pathways in response to various stress stimuli, including oxidative stress. The function of ASK1 is associated with the activation of apoptosis and thus plays a key role in the pathogenesis of multiple diseases including cancer, neurodegeneration or cardiovascular diseases. The natural inhibitor of ASK1 is a ubiquitous oxidoreductase, thioredoxin, which is probably bound to N-terminus of ASK1, thus preventing a homophilic interaction and subsequent ASK1 activation. It has been suggested, that upon oxidative stress and oxidation of thioredoxin active site, thioredoxin dissociates from ASK1, but the structural basis of this interaction remains unclear.

Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2) is a member of CaM kinase pathway that activates CaMKI, CaMKIV and AMPK involved in gene expression regulation or apoptosis activation. Function of this protein is often associated with neuropathology, carcinogenesis and obesity. CaM kinases are activated via binding Ca^{2+} sensor protein calmodulin (CaM). Structural studies of CaMKK2 revealed distinct structural features, suggesting a potentially different activation mechanism. CaMKK2 is also regulated and inhibited through phosphorylation. It has been identified two potential phosphorylation sites, Ser¹⁰⁰ and Ser⁵¹¹, for 14-3-3 protein binding. These universal dimers regulate their multiple phosphorylated substrates through conformational modulation or masking of signaling sequences. However, the role of 14-3-3 proteins in CaMKK2 regulation is not sufficiently understood.

Biophysical and structural characterization of the complexes allowed us to describe the interaction interface, to estimate binding affinity, stoichiometry and complex dynamics, thus contributing to elucidation of these regulatory mechanisms.

Seznam zkratek

AANAT	serotonin-N-acetyltransferasa
ASK1	z angl. A poptosis S ignal regulating K inase -1
AID	autoinhibiční doména
AMPK	AMP-aktivovaná protein kinasa
ASK1-TBD	thioredoxin-vazebná doména ASK1
CaM	kalmodulin
CaMKK2	z angl. Calcium/Calmodulin dependent kinase kinase 2
CBD	kalmodulin vazebná doména
CC doména	z angl. C oiled- C oil domain
CDK5	cyclin-dependentní kinasa 5
CRR	centrální regulační oblast
DAMMIN	z angl. D ummy A tom M odel M inimisation
DAPK	z angl. D eath A ssociated P rotein K inase
EOM	z angl. E nsemble O ptimization M ethod
ERK	extracelulární signální regulační kinasa
ESI-FTMS	z angl. E lectron S pray I onization F ourier T ransform M ass S pectrometry
FOXO	z angl. F orkhead- box transcription factor O
GSK3	z angl. G lycogen S ynthase K inase 3
H/D výměna	vodík/deuteriová výměna

TRAF	z angl. T umor Necrosis R eceptor A ssociated F actors
TRX1	thioredoxin-1
6×His-G_B1	B1 doména proteinu G značená histidinovou kotvou na N-konci
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
JNK	c-Jun N-terminální kinasa
KD	kinasová doména
MLCK	z angl. M ynosin L ight C hain K inase
NSD	z angl. N ormalized S patial D iscrepancy
ot/min	otáčky za minutu
pCaMKK2	fosforylovaná forma CaMKK2
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PKA	cAMP-dependentní proteinkinasa
PH doména	z angl. P lecstrin H omology domain
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PP1	proteinfofatasa 1
protein G_B1	B1 doména proteinu G
RP insert	úsek CaMKK2 bohatý na Arg a Pro a Gly
Sup	Superdex
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TBD	thioredoxin vazebná doména (z angl. T hioredoxin- B inding D omain)
TPR	z angl. T etratricopeptide R epeats
w/w	hmotnost/hmotnost (z angl. weight/weight)
w/v	hmotnost/objem (z angl. weight/volume)

Obsah

Abstrakt CZ	5
Abstract EN	6
Seznam zkratk	7
1 Úvod	12
2 Přehled literatury	14
2.1 Proteinkinasy	14
2.1.1 Struktura katalytické domény a mechanismus přenosu fosfátu	15
2.2 MAP signální kaskády	17
2.2.1 Proteinkinasa ASK1	17
2.2.2 Thioredoxin-1 (TRX1)	21
2.2.3 Interakce mezi proteinkinasou ASK1 a thioredoxinem	22
2.3 Ca ²⁺ -signalizace	23
2.3.1 Kalmodulin	24
2.3.2 Ca ²⁺ /CaM-dependentní signální kaskády	25
2.3.3 CaM kinasy (CAMK)	26
2.3.4 CaM kinasy kinasy (CaMKK)	28
2.3.5 Proteiny 14-3-3	32
2.3.6 Interakce mezi CaMKK a proteinem 14-3-3	36
2.3.7 Interakce mezi CAMK a Ca ²⁺ /CaM	37
3 Cíl práce	39
4 Metody a materiál	40
4.1 Použitý materiál	40
4.1.1 Chemikálie	40
4.1.2 Přístroje	41
4.2 Expres a purifikace proteinů	44
4.2.1 Expres a purifikace ASK1-TBD	51
4.2.2 Expres a purifikace TRX1	52
4.2.3 Expres a purifikace CaMKK2	52
4.2.4 Expres a purifikace CaM	53
4.3 Biofyzikální a strukturní charakterizace	54

4.3.1 Stanovení volných thiolových skupin a oxidace proteinů.....	54
4.3.2 SDS-PAGE za neredukujících podmínek.....	55
4.3.3 Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentačních rychlostí.....	55
4.3.4 Limitovaná defosforylace s použitím SDS-Phos-tag-PAGE.....	60
4.3.5 Hmotnostní spektrometrie	61
4.3.6 Diferenční skenovací fluorimetrie.....	66
4.3.7 CD spektroskopie.....	67
4.3.8 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie	68
4.3.9 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS).....	70
5 Výsledky	74
5.1 Exprese a purifikace	74
5.1.1 ASK1-TBD	74
5.1.2 TRX1.....	76
5.1.3 CaMKK2	76
5.1.4 CaM	80
5.1.5 14-3-3γ.....	82
5.2 Biofyzikální a strukturní charakterizace komplexu ASK1-TBD:TRX1 za redukujících podmínek.....	83
5.2.1 Sedimentační analýza ASK1-TBD a TRX1	83
5.2.2 Alkylace cysteinů spojená s MS detekcí	90
5.2.3 Časově rozlišená fluorescence.....	92
5.2.4 CD spektroskopie.....	96
5.2.5 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS).....	97
5.3 Biofyzikální a strukturní charakterizace interakce mezi ASK1-TBD a TRX1 za oxidujících podmínek.....	100
5.3.1 Stanovení volných thiolových skupin proteinu.....	100
5.3.2 Sedimentační analýza ASK1-TBD a TRX1	101
5.3.3 Alkylace spojené s MS detekcí	103
5.3.4 Časově rozlišená fluorescence.....	108
5.3.5 Strukturní modelování komplexu ASK1-TBD:TRX1	109
5.4 Biofyzikální a strukturní charakterizace komplexu pCaMKK2:14-3-3γ.....	112
5.4.1 Sedimentační analýza pCaMKK2 a 14-3-3γ	112
5.4.2 CD spektroskopie.....	114

5.4.3 SAXS.....	115
5.4.4 Strukturní modelování komplexu pCaMKK2 S100:14-3-3 γ Δ C	118
5.4.5 Limitovaná defosforylace s využitím SDS-Phos-tag-PAGE	120
5.5 Biofyzikální a strukturní charakterizace komplexu CaMKK2:Ca ²⁺ /CaM.....	122
5.5.1 SAXS.....	122
5.5.2 H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií.....	125
5.5.3 Chemické zesíťení spojené s hmotnostní spektrometrií.....	130
5.5.4 Strukturní modelování komplexu CaMKK2 KD: Ca ²⁺ /CaM	131
6 Diskuze	133
6.1 Interakce mezi proteinkinasou ASK1 a TRX1.....	133
6.2 Interakce mezi CaMKK2 a 14-3-3 γ	138
6.3 Interakce mezi CaMKK2 a Ca ²⁺ /CaM	139
7 Závěr	142
Seznam citované literatury.....	145
Přílohy.....	156

1 ÚVOD

Chemická signalizace tvoří rozsáhlou komunikační síť mezi buňkami, které tak mohou adekvátně reagovat na změny mikrookolí. V mnoha případech může být nevratné poškození buněčné signalizace i letální. Současný výzkum soustředí veškeré úsilí do pochopení funkce jednotlivých článků těchto složitých kaskád, aby bylo možné jejich množství a aktivitu efektivně regulovat a zabránit tak vývoji patologických stavů. V rámci této disertační práce jsou diskutovány dva biologicky významné procesy, které se na mnoha bodech buněčné signalizace stýkají a pojí je i podobný regulační mechanismus zprostředkovaný vazbou proteinů 14-3-3 (viz obr. 1.1, str. 13).

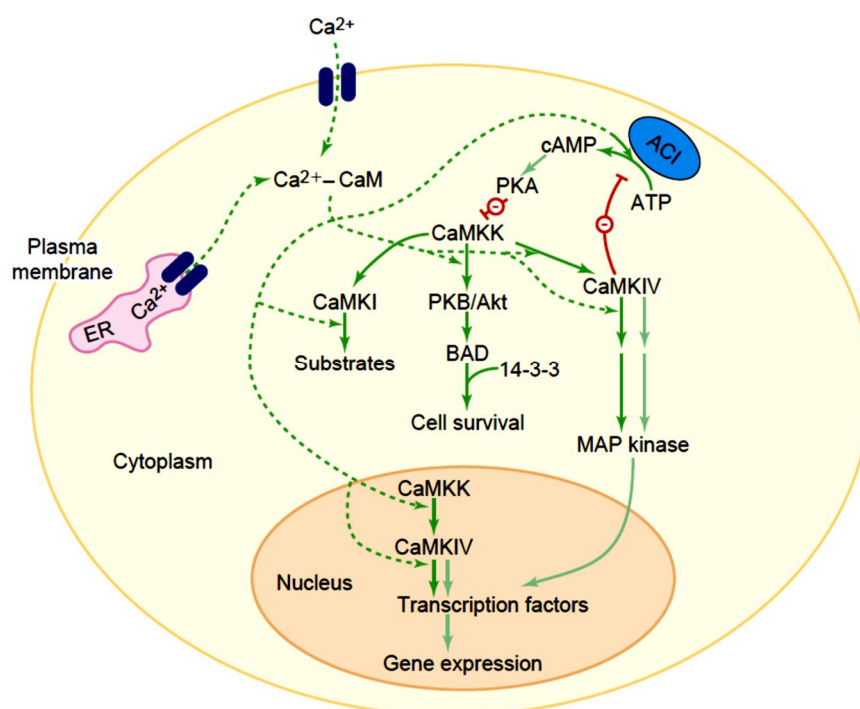
1. Proteinkinasa ASK1

ASK1 reprezentuje skupinu MAP3K kinas, které se uplatňují při buněčném obranném mechanismu proti oxidativnímu stresu. Její regulace je klíčová pro spouštění mnoha biologických dějů, zejména apoptosy, imunitní odpovědi a buněčné diferenciace. Dysregulace tohoto enzymu stojí za vývojem mnoha závažných onemocnění, zejména rakoviny či kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob. V rámci tohoto projektu jsme se zaměřili na studium mechanismu aktivace ASK1 v redukčních a oxidačních podmínkách. Na základě biofyzikální charakterizace interakce s jejím fyziologickým inhibitorem thioredoxinem, se nám podařilo částečně objasnit mechanismus tvorby komplexu v redukovaném prostředí. Představy ohledně dění při oxidativním stresu jsou však velmi nekonzistentní i vzhledem k variabilitě používaných oxidačních podmínek v jednotlivých studiích. V této studii se na základě cílené mutageneze cysteinů thioredoxinu i ASK1 a klíčovými výsledky z hmotnostní spektrometrie podařilo tento děj do jisté míry objasnit. Získané výsledky je v budoucnu nutné podpořit strukturními daty s vysokým rozlišením získaných např. pomocí NMR, na nichž probíhají intenzivní práce.

2. Ca^{2+} /kalmodulin dependentní kinasa 2 (CaMKK2)

Signalizace pomocí vápníkových iontů je nenahraditelná z důvodu propojení s dalšími signalizačními pochody v buňce vedoucích k regulaci genové exprese nebo apoptose. CaMKK2 je prvním nejdůležitějším členem této Ca^{2+} /kalmodulin dependentní

kaskády a proto její dysfunkce vede např. k neuropatologickým projevům nebo karcinogenezi. Zároveň je také důležitým aktivátorem AMP-dependentní proteinkinasy, jíž se přisuzuje role v energetickém metabolismu. Z toho důvodu je CaMKK2 považována za potenciální terapeutický cíl při léčbě obezity – jedné z největších hrozeb současnosti. Mechanismus regulace prostřednictvím proteinu 14-3-3 je doposud neznámý a jeho objasnění bylo hlavním cílem studia této práce. Zároveň jsme se zaměřili i na roli CaM při aktivaci CaMKK2, která probíhá odlišným mechanismem než u ostatních zástupců této kaskády.



Obr. 1.1 Schéma Ca^{2+} -CaM signální kaskády a její role v buněčném metabolismu. Zástupci Ca^{2+} -CaM kinas regulují buněčný vývoj nepřímou aktivací MAP kinas a dalších efektorů buněčné dráhy. Aktivní MAP kinasy jsou transportovány do jádra, kde fosforylují transkripční faktory. CaMKIV může také fosforylovat adenylátcyklastu typu I, což vede k její inaktivaci a poklesu hladiny cAMP. Zvýšená intracelulární hladina cAMP funguje jako negativní zpětná vazba pomocí aktivace cAMP-dependentní kinasy (PKA), která fosforylací inaktivuje CaMKK. CaMKK i CaMKIV se vyskytují také v jádře, kde ovlivňují genovou expresi. 14-3-3 proteiny selektivně rozpoznávají fosforylované proteiny na Ser/Thr, včetně regulace CaMKK, která zde není vyznačena. Tmavě zelené (aktivační) dráhy, jsou bezprostředně řízeny regulací skrze vazbu Ca^{2+} -CaM. Světle zelené dráhy jsou nezávislé na aktivaci pomocí Ca^{2+} -CaM. Červené dráhy vyznačují inhibiční mechanismy. BAD – pro-apoptotický člen Bcl-2 rodiny; ER – endoplazmatické retikulum; PKB – protein kinasa B (Soderling, 1999).

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Proteinkinasy

Proteinkinasy zahrnují širokou skupinu enzymů katalyzujících přenos fosfátu z gama pozice ATP na seriny, threoniny nebo tyrosiny proteinových substrátů. Na základě těchto předpokladů jsou kinasy klasifikovány na serin-threoninové, tyrosinové a kinasy s duální specifitou (Adams, 2001; Peng *et al.*, 2013). Dnes lze pouze stěží hledat nějaký biochemický děj, který je přímo či nepřímo ovlivněn proteinovou fosforylací. Fosfátová skupina ovlivňuje vlastnosti proteinu v důsledku jejího silného negativního náboje, objemné velikosti a schopnosti tvořit širokou síť vodíkových vazeb. Tato modifikace může značně ovlivnit flexibilitu a tvar proteinového řetězce, což má jistý dopad na jeho funkci. Tímto způsobem je v buňce regulována bezmála třetina proteinů. Kinasy ve společnosti fosfatas zaručují rovnováhu mezi různými fosforylačními stavy daného proteinu. Narušení této rovnováhy vede k patologickým projevům, např. karcinogenezi nebo zánětlivým procesům. Mnoho genetických změn, které hrají kauzální roli v nádorovém fenotypu, zahrnuje mutace proteinových kinas a fosfatas (Hunter, 2002). Příkladem lze uvést i s mikrotubuly asociovaný protein Tau, jehož hyperfosforylovaný stav je klasickým markerem Alzheimerovy choroby a neurologických chorob (Lee *et al.*, 2001).

První důkaz ohledně existence kinas byl doložen skupinou Burnetta a Kennedyho, v roce 1954. Od té doby se kinasy staly předmětem detailního studia v důsledku jejich klíčové funkce při regulaci proteinů. Odhaduje se, že v lidském genomu je více než 500 genů kódujících proteinkinasy, tedy asi 2 % z celkového počtu lidských genů. Souhrnně se tento soubor nazývá kinom (Manning, 2002).

Kinasy mají substrátovou specifitu a rozeznávají tzv. konsenzuální sekvence, v nichž leží odpovídající fosforylační místo. Např. typickým motivem pro PKA je -R-R-X-S/T-hyd.¹ Nejvyšší afinita k přenosu fosfátu je v případě, když jsou přítomny oba argininy, ale většinou postačuje přítomnost několika bazických reziduí před fosforylačním místem (Kemp *et al.*, 1977).

¹ Hyd. - hydrofobní aminokyselina

2.1.1 Struktura katalytické domény a mechanismus přenosu fosfátu

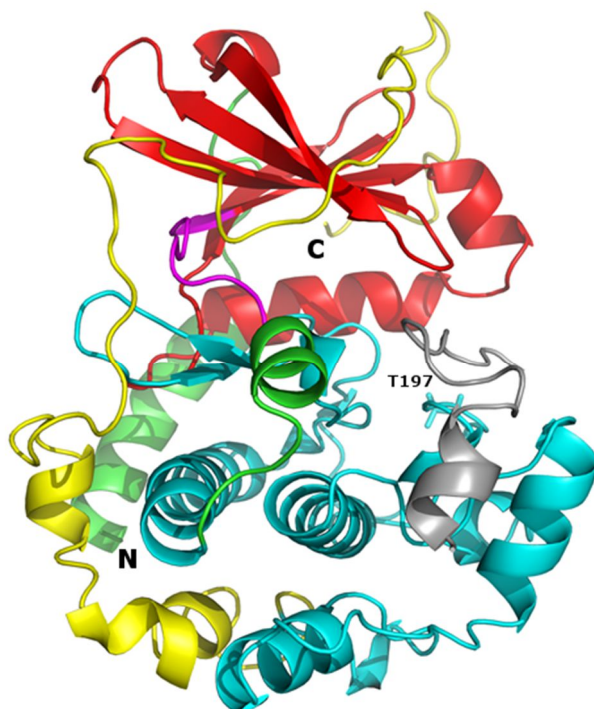
První struktura katalytické domény cAMP-dependentní kinasy (PKA) poskytla první náhled do mechanismu jejich katalytické funkce (Knighton *et al.*, 1991).

Na základě sekvenčního porovnání různých kinas je známo, že sdílí 250 aminokyselin dlouhý úsek nezbytný pro jejich aktivitu (viz příloha 1). Tato část zahrnuje malou Mg^{2+} -ATP vazebnou doménu s převažující β -strukturou a větší substrátovou doménu tvořenou převážně alfa-helixy. Domény jsou spojeny krátkým linkerem, který vytváří katalytické místo enzymu pro vazbu Mg^{2+} -ATP a substrátu (Adams, 2001; Knighton *et al.*, 1991). Posledních 70 aminokyselin na C-konci PKA tvoří rozvolněný řetězec, rozkládající se přes povrch obou domén a tak patrně plní svoji úlohu při rozpoznávání substrátu i ATP (Knighton *et al.*, 1991).

Po objasnění struktury apoenzymu PKA bylo zjištěno, že před navázáním ATP je enzym v tzv. otevřené konformaci, která je stabilizována mnohočetnými hydrofobními interakcemi mezi rezidui obou domén v katalytické dutině. Tato spojení po vazbě ATP generují jakýsi „skluz“ umožňující částečnou rotaci domény. U jiných kinas je rotace o 90° zprostředkována pouze flexibilitou spojovacího linkeru, u PKA dochází ke kooperaci obou zmíněných mechanismů (Akamine *et al.*, 2003).

Pro úspěšný průběh fosforylační reakce je nezbytná součinnost mnoha aktivačních a regulačních mechanismů. Fosforylace aktivační smyčky hraje velmi podstatnou roli, jelikož je přímo spřažena s katalytickým mechanismem. Je známo, že fosforylace Thr¹⁹⁷ aktivační smyčky PKA zvyšuje její aktivitu až 3násobně. V případě absence tohoto fosforylačního místa, je tato schopnost kompenzována přítomností negativně nabitých aminokyselin (Johnson *et al.*, 1996). Příčinou aktivace enzymu je pravděpodobně zvýšená pohyblivost aktivační smyčky, která otevírá cestu substrátu do vazebného místa a napomáhá tak rychlejšímu přenosu fosfátu na substrát díky dalším stabilizačním efektům (Hagopian *et al.*, 2001). V rámci vysoce konzervovaného úseku Asp-Phe-Gly (DFG) motivu aktivační smyčky zastává nejdůležitější funkci Asp¹⁸⁴. Ten se účastní koordinační vazby s hořčnatými ionty a je nezbytný pro chelataci β a γ fosfátových skupin ATP. Hořčnaté ionty mají v katalytické funkci dvojí účel: (i) pomáhají orientovat γ fosfátovou skupinu pro snadný přenos na substrát; (ii) odstiňují silný negativní náboj fosfátu, aby nedocházelo k elektrickým repulzím s příchozí hydroxylovou skupinou substrátu.

(Gibbs & Zoller, 1991). Z těchto důvodů je i většina proteinkinasových inhibitorů cílena na konzervovaný DFG motiv (Peng *et al.*, 2013).



Obr. 2.1: Krystalová struktura katalytické podjednotky c-AMP dependentní proteinkinasy (PKA) s peptidovým inhibitorem o délce 20 AMK (šedá barva). Červeně je vyznačena menší doména účastnící se vazby Mg^{2+} -ATP (tzv. N-koncový lalok). Modro-zelená doména představuje část proteinu vázající substrát (C-koncový lalok). Posledních 70 aminokyselin rozvolněného řetězce je vyznačeno žlutě. Růžová část představuje flexibilní linker mezi malou a velkou doménou. PDB kód: 2CPK (Knighton *et al.*, 1993).

Mezi další konzervované úseky proteinkinasy patří motiv bohatý na glyciny, který je opět nezbytný pro vazbu a přenos fosfátu. Typická struktura tohoto motivu je G-X-G-X-X-G a nachází se v blízkosti N-konce katalytické domény. Tato pozice glycinů je ideální z důvodu minimálního stérického bránění i maximální flexibility (Hemmer *et al.*, 1997). Správná orientace α a β fosfátových skupin, je zajištěna nepřímo přes solný můstek tvořený mezi Glu⁹¹ a Lys⁷². Konzervovaný Glu⁹¹, který je součástí helixu C malé domény, se navíc nachází v těsné blízkosti vodíkového atomu amidové vazby Phe¹⁸⁵ z DFG motivu substrátové domény (Akamine *et al.*, 2003).

Asp¹⁶⁶ (aktivní místo) se přímo účastní vazby s hydroxylem substrátů, což umožňuje nukleofilní atak ze strany γ fosfátu (Madhusudan *et al.*, 1994). Přestože

existují strukturní odlišnosti PKA od ostatních druhů kinas, lze předpokládat, že mechanismus přenosu fosfátu je zachován (Goldberg *et al.*, 1996).

2.2 MAP signální kaskády

Mitogenem-aktivované proteinkinasové signální kaskády (MAP) přenáší signály z membránových receptorů k vnitrobuněčným cílům, které dále řídí osud buňky. Funkce MAP kinas je spojená s kontrolou mnoha biologických dějů, zejména apoptosy, embryogeneze, buněčné diferenciaci a proliferace. MAP kinasová signální kaskáda vytváří hierarchický systém, ve kterém apikální kinas (MAP3K) fosforylují MAP kinas kinas a ty aktivují poslední články tohoto řetězce, MAP kinas (Dhillon *et al.*, 2007; Hayakawa *et al.*, 2012; Pearson *et al.*, 2001). Mezi MAP kinas se řadí např. extracelulární signální regulační kinas (ERK), p38, c-jun N-terminální kinas (JNK) a jejich isoformy. Tyto signální mechanismy jsou evolučně velmi konzervované a vyskytují se u všech eukaryotických říší (Widmann *et al.*, 1999). Enzymová kaskáda složená z jednotlivých zástupců MAPK umožňuje komplexní regulaci a vysokou amplifikaci signálu (Pearson *et al.*, 2001). Mezi kinas MAP3K se řadí skupina ASK (1-3), které spouští buněčnou odpověď v reakci na redoxní stres nebo zánětlivé cytokiny a hrají důležité role ve vrozené imunitě a při virových infekcích (Miyakawa *et al.*, 2015; Geleziunas *et al.*, 2001; Okazaki *et al.*, 2015).

2.2.1 Proteinkinasa ASK1

ASK1 reprezentuje jednu ze tří isoform podskupiny MAP3K, která je aktivována řadou vnějších faktorů, jako jsou oxidativní stres, stres endoplazmatického retikula, zvýšená intracelulární hladina vápenatých iontů, skupina cytokinů (TNF- α a FasL) či endotoxin lipopolysacharid (Matsuzawa *et al.*, 2005; Nishitoh, 2002; Takeda *et al.*, 2004). Jedná se o serin/threonin proteinkinasu, která přímou fosforylací dalších efektorů spouští p38 a JNK signální dráhy vedoucí k apoptose nebo zánětu (Chen *et al.*, 1999; Ichijo *et al.*, 1997). Distribuce ASK1 v cytoplasmě a mitochondriích dokazuje, že se účastní vnější i vnitřní apoptotické dráhy, a tím ovlivňuje např. aktivaci caspasy 3 a 9 (Hatai *et al.*, 2000; Zhang, 2004).

Patologická funkce ASK kinas na základě jejich změněné aktivity (zvýšené či snižené) je spojena s vývojem nádorových onemocnění, kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob (Ichijo *et al.*, 1997). Například inhibice ASK1 kinasy působí pozitivně proti rakovině žaludku, ale v jiném případě mohou inaktivační mutace přispět k vývoji melanomu (Prickett *et al.*, 2014; Stark *et al.*, 2011). Inhibitory ASK1 rovněž přináší slibné výsledky v léčbě amyotrofické laterální sklerosy na myších modelech (Fujisawa *et al.*, 2016). To vše činí z ASK1 zajímavý terapeutický cíl, který je vhodné blíže studovat.

Struktura ASK1 je velmi konzervovaná napříč eukaryotickými organismy. Všechny kiny ASK (1-3) spolu sdílí společnou architekturu, ve které je centrální kinasová doména obklopena dalšími regulačními doménami, jejichž vzájemná komunikace a oligomerizace je nezbytnou součástí aktivace. Lidský homolog ASK1 (viz obr. 2.2, str. 20) obsahuje 1374 aminokyselinových zbytků zahrnující kinasovou doménu, centrální regulační oblast (CRR – z angl. **C**entral **R**egulatory **R**egion), a thioredoxin-vazebnou doménu (TBD – z angl. **T**hioredoxin **B**inding **D**omain). Na koncích proteinu se také nachází predikované „coiled-coil“ (CC) domény, zodpovědné za homo-oligomerizaci ASK1 (Fujino *et al.*, 2007). V úseku sekvence 384-655 se nachází samostatná oblast pro faktory TRAF, které hrají důležitou úlohu při aktivaci (Fujino *et al.*, 2007; Hoeflich *et al.*, 1999).

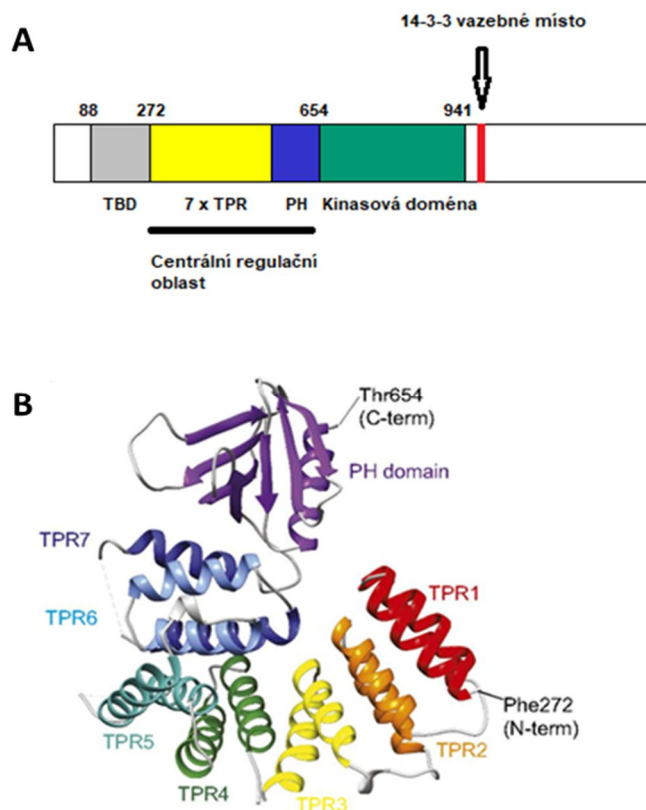
Regulace ASK1 probíhá v rámci vysokomolekulárního multiproteinového komplexu – ASK1 signalosomu, který dynamicky mění svou kompozici v reakci na oxidativní stres (Federspiel *et al.*, 2016; Noguchi *et al.*, 2005). V jádru signalosomu se s jistotou nachází ASK1, ASK2 a proteiny 14-3-3, které kooperují s nespočtem dalších proteinů za účelem flexibilní regulace MAP signální kaskády a dalších dějů. (Federspiel *et al.*, 2016).

Důležitou úlohu v regulaci ASK1 kinasové aktivity mají postranlační modifikace a vazba inhibitorů, proteinu 14-3-3 a thioredoxinu. V důsledku stresu vyvolaného redoxní nerovnováhou a vlivem konformačních změn homo-oligomeru dochází k aktivaci ASK1 autofosforylací Thr⁸³⁸ a Thr⁸⁴² (Bunkoczi *et al.*, 2007; Tobiume *et al.*, 2002). Pro aktivaci je klíčová nejen autofosforylace Thr⁸³⁸ v rámci aktivačního segmentu, která podmiňuje homo-oligomerizaci v C-terminální části proteinu, ale i vazba faktorů TRAF2 a TRAF6, které podporují homofilní vazbu

i v rámci N-koncové domény (Fujino *et al.*, 2007; Hoeflich *et al.*, 1999). Vazba faktorů TRAF je podmíněna disociací thioredoxinu (Liu *et al.*, 2000).

Doposud je známá pouze krystalová struktura katalytické domény a centrální regulační oblasti (Bunkoczi *et al.*, 2007; Weijman *et al.*, 2017). Z krystalové struktury kinasové domény vyplývá, že má silnou tendenci vytvářet antiparalelní dimery, které jsou fyziologicky relevantní a podobným způsobem pravděpodobně dochází i k heterooligomerizaci mezi ASK1 a ASK2 (Takeda *et al.*, 2007). Vazebné rozhraní dimeru navíc obsahuje všechna konzervovaná rezidua i autofosforylační místa Thr⁸¹³, Thr⁸³⁸ a Thr⁸⁴². Mutagenezní studie těchto autofosforylačních míst rovněž naznačují, že jsou spíše důležitá pro vazbu/disociaci dalších signálních proteinů v rámci ASK1 signalosomu než k podnícení katalytické aktivity.

Struktura centrální regulační oblasti byla objasněna relativně nedávno a přináší nové poznatky do regulačního mechanismu. Tato struktura zahrnuje celkem 14-helixů (viz obr. 2.2 B, str. 20), které vytváří 7 tetratricopeptidových opakování (TPR) a tzv. plekstrinovou doménu (PH, fialová). Ze SAXS analýzy vyplývá, že TPR doména vytváří kompaktní uspořádání díky blízkému fyzickému kontaktu reziduí mezi helixy. Uvnitř této sekvence se má nacházet i predikovaná NCC oblast (z angl. N-terminal Coiled-Coil), která je však součástí TPR domény a proto je velmi nepravděpodobné, že se účastní konvenční CC oligomerizace. CRR i ASK1 zahrnující sekvenci 88-941 (TBD, CRR a kinasová doména) se mimo jiné v roztoku jeví jako monomerní. Oblast CRR může splňovat několik funkcí. Za první, modulovat strukturu ASK1 substrátu (MKK6) tak, že zpřístupní cílové fosforylační místo pro kinasovou doménu. Za druhé, funguje jako mediátor autoinhibičních interakcí mezi kinasovou doménou a ASK1-TBD. Celá struktura ASK1 (88-941) se tak patrně nachází v dynamické rovnováze mezi dvěma stavy, otevřeným (aktivní) a zavřeným (inaktivní), ve které se ASK1-TBD dostává do blízkého kontaktu s kinasovou doménou. Navržený regulační mechanismus předpokládá, že autoinhibiční konformace je stabilizována vazbou thioredoxinu. Přestože tato studie mírně zpochybňuje oligomerizaci v N-koncové oblasti, nelze vyloučit, že na oligomerizaci celého proteinu se primárně nepodílí C-koncová CC oblast proteinu (1236-1293), která ve struktuře chybí. Na základě SAXS analýzy dále vyplývá, že ASK1-TBD zaujímá v obou konformacích kompaktní tvar (Weijman *et al.*, 2017).



Obr. 2.2 A – Strukturní schéma ASK1 s vyznačenými důležitými oblastmi. Thioredoxin-vazebná doména (TBD, šedá), sedm tetratricopeptidových opakování (7 x TPR, žlutá), plekstrinová doména (PH, fialová) a kinasová doména (zelená). Vazebné místo pro protein 14-3-3 (Ser⁹⁶⁶) je vyznačeno červeně (upraveno dle Weijman *et al.*, 2017; Bunkoczi *et al.*, 2007). **B** – Krystalová struktura ASK1-CRR (269-658). PDB kód: 5ULM (Weijman *et al.*, 2017).

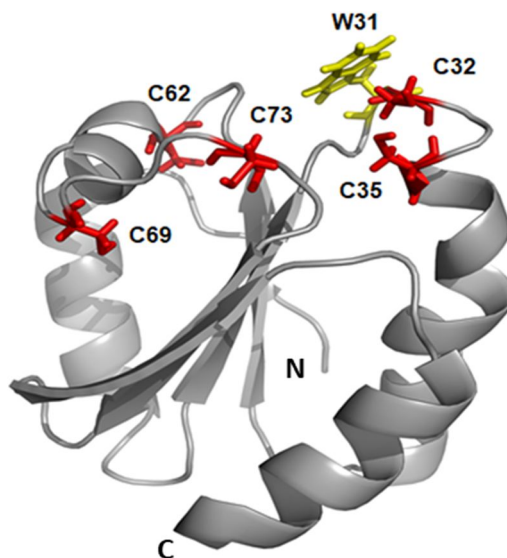
Další regulační místa se nachází na N a C-konci proteinu. Fosforylace Ser⁸³ prostřednictvím kinasy Akt a fosforylace Ser¹⁰³⁴ se také uplatňují v negativní regulaci ASK1 (Fujii *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2001). V blízkosti kinasové domény je ještě přítomen serin 966, jehož fosforylace vede k vazbě dalšího významného inhibitoru ASK1, proteinu 14-3-3. Tento serin se nachází v predikované nestrukturované oblasti, která patří mezi časté cíle proteinů 14-3-3. Strukturní model katalytické domény v komplexu s proteinem 14-3-3 naznačuje, že pouze jeden protomer z dimeru 14-3-3 váže jeden protomer z dvojice ASK1, což vysvětluje i pouze částečnou inhibici kinasové aktivity. Vzájemná interakce je velmi dynamická a konformačně heterogenní, což je v souladu s relativně slabou vazebnou afinitou mezi oběma

proteiny. Strukturní analýza rovněž naznačila, že protein 14-3-3 interaguje nejen s vazebným motivem obsahujícím Ser⁹⁶⁶, ale také s několika oblastmi kinasové domény v blízkosti katalytického centra. Z toho plyne, že mechanismus inhibice může být založen na modulaci aktivního centra nebo blokaci vazby substrátů ASK1 (Petrvalska *et al.*, 2016). Při oxidativním stresu dochází k defosforylaci serinu 966 prostřednictvím fosfatasy kalcineurin, disociaci proteinu 14-3-3 a obnově katalytické aktivity ASK1 (Goldman *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006).

2.2.2 Thioredoxin-1 (TRX1)

Thioredoxin je enzymový kofaktor a oxidoreduktasa o velikosti 12 kDa, která udržuje redoxní rovnováhu vnitřního prostředí. Uplatňuje se především v redoxní signalizaci, apoptose či jako růstový faktor stimulující buněčnou proliferaci (Watson, 2004). Doposud jsou známy dvě isoformy thioredoxinu, z nichž TRX2 se dominantně nachází v mitochondriích a TRX1 se vyskytuje v cytosolu (Zhang, 2004). Molekula thioredoxinu se skládá z pěti β -skládaných listů tvořících hydrofóbní jádro obklopené čtyřmi α -helixy (viz obr. 2.3, str. 22). V rámci struktury je přítomen katalytický motiv ³¹WCGPC³⁵, který zahrnuje aktivní centrum tvořené Cys³² a Cys³⁵. Vodíková vazba mezi sulfhydryly Cys³² a Cys³⁵ je příčinou zvýšené nukleofility Cys³², který se v redukujícím prostředí cytosolu nachází ve formě thiolátu. Tato vlastnost Cys³² je nezbytným prvkem pro redukci disulfidické vazby oxidovaných substrátů (Weichsel *et al.*, 1996). V rámci katalytického motivu je rovněž přítomen konzervovaný Trp³¹, který prochází konformační změnou při oxidaci cysteinů v aktivním centru nebo jejich mutagenезi (Qin *et al.*, 1996; Weichsel *et al.*, 1996). Kromě dvou cysteinů aktivního centra, savčí isoforma thioredoxinu obsahuje další tři významné cysteiny, které jsou kritické pro aktivitu thioredoxinu (Hashemy & Holmgren, 2008). Cystein 62 a 69 se vyskytuje v rámci helixu α 3 a Cys73 na hydrofóbním povrchu thioredoxinu (Watson *et al.*, 2003). Při zvýšené oxidaci dochází k uzavření disulfidického můstku Cys⁶²-Cys⁶⁹, který má vzhledem k poměrně velké vzdálenosti (~18Å) rozsáhlý dopad na strukturu a na aktivitu TRX1 (Hashemy & Holmgren, 2008). Při silné oxidaci dochází rovněž k tvorbě neaktivního kovalentního homodimeru skrze Cys⁷³ (Ren *et al.*, 1993; Watson *et al.*, 2003). Zpětná redukce thioredoxinu do aktivního stavu je zajištěna činností dvou enzymů,

thioredoxin reduktasy a NADPH-dependentního selenoflavoproteinu (Watson, 2004).

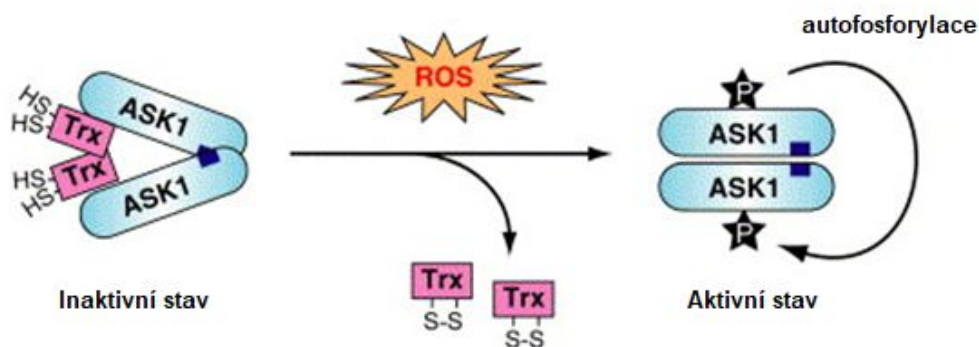


Obr. 2.3 Krystalová struktura TRX1. Cysteiny jsou vyznačeny červenou barvou, Trp³¹ žlutou barvou. PDB kód: 1TRU (Clare *et al.*, 1994).

2.2.3 Interakce mezi proteinkinasou ASK1 a thioredoxinem

V sekvenci ASK1 je pro interakci s thioredoxinem podstatný aminokyselinový úsek 46-277 (Fujino *et al.*, 2007). Inaktivace ASK1 je zprostředkována přímou protein-proteinovou interakcí s TRX1 v redukované formě (Saitoh *et al.*, 1998). Prvotní představy ohledně aktivace ASK1 zahrnovaly mechanismus, při kterém v oxidujících podmínkách dochází k tvorbě disulfidického můstku mezi Cys³² a Cys³⁵ v aktivním centru TRX1 a jeho následné disociaci (viz obr. 2.4, str. 23). Podobný efekt vedoucí k inhibici vzájemné interakce vyvolala i mutace cysteinů v aktivním centru a jejich nahrazení serinem (Fujino *et al.*, 2007; Liu, 2002; Saitoh *et al.*, 1998). Doposud však není jasné, zda interakce mezi ASK1 a TRX1 je založena na slabých nekovalentních interakcích nebo zahrnuje i tvorbu mezimolekulárních disulfidů. Tuto možnost zvažují autoři studie Nadeau *et al.* Dle jejich návrhu oxidativní stres podněcuje tvorbu intermolekulárních disulfidických vazeb v N-koncové a C-koncové části proteinu ASK1, což je nezbytným prvkem její aktivace. Zároveň předpokládají, že

i vazba mezi ASK1 a thioredoxinem zahrnuje tvorbu intermolekulárního disulfidického můstku mezi Cys²⁵⁰ a Cys³² z katalytického centra TRX1 (Nadeau *et al.*, 2007, 2009). Mutace ASK1 na pozicích Cys²⁵⁰ a Cys³⁰ se ukázaly jako kritické pro vazbu TRX1 (Zhang, 2004).



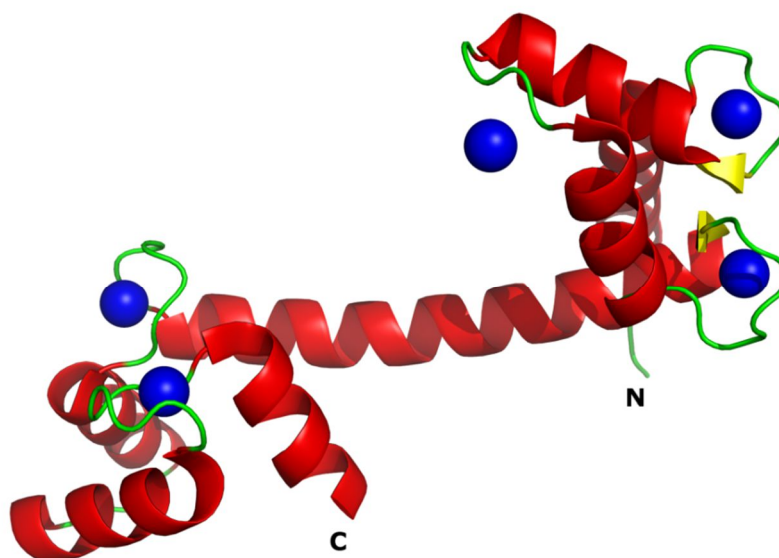
Obr. 2.4 Jeden z možných mechanismů aktivace ASK1 při oxidativním stresu. Při oxidativním stresu dochází k oxidaci TRX1 a jeho disociaci. Vazba faktorů TRAF a oligomerizace ASK1 umožňuje autofosforylaci Thr838 a její úplnou aktivaci (upraveno dle Hayakawa *et al.*, 2012; Saitoh *et al.*, 1998).

2.3 Ca²⁺-signalizace

Aktivace Ca²⁺-CaM dependentních kaskád je reakcí na změnu intracelulární koncentrace vápníku, která je za klidového stavu udržována na velmi nízké hodnotě, 50-100 nM. Vápníkové kationy jsou vysoce reaktivní a dlouhodobé vystavení jeho vysokým dávkám může být pro buňku letální. Nízká koncentrace a vysoká reaktivita vápenatých iontů jsou vlastnosti, které z nich činí efektivní signální molekulu. Existuje široké množství proteinových pump a kanálů, které vzájemnou součinností udržují jeho vysoký koncentrační gradient mezi vnějším prostředím a cytolem (Berridge, 2002; Bootman *et al.*, 2001). Z důvodu nízké rozpustnosti sloučenin vápníku, jsou jeho účinky zprostředkovány vazbou na senzorový protein. Mezi nejčastější primární senzory vápníkových kationů v cytosolu patří kalmodulin a troponin C. Zatímco funkce troponinu C je omezena na aktivaci svalové kontrakce, kalmodulin je spojován s nespočtem biologických procesů včetně fertilizace, buněčné proliferace a apoptosy (Berridge *et al.*, 2000).

2.3.1 Kalmodulin

Kalmodulin je strukturně konzervovaný protein o velikosti 17kDa, který obsahuje N a C-terminální lalok spojený velmi flexibilním helikálním linkerem (viz obr. 2.5). Tento linker umožňuje zaujmout kalmodulinu velké množství konformací při vazbě na cílové proteiny. Každý z těchto laloků obsahuje tzv. EF-hand motivy, které mohou celkově vázat až čtyři ionty vápníku. Helixy EF-hand motivu definují hydrofobní kapsu bohatou na obsah methioninu a fenyylalaninu, které jsou při saturaci kalmodulinu vápníkem exponovány do okolního prostředí a účastní se vazby s cílovým proteinem (Wilson & Brunger, 2000). Z toho důvodu je i interakce mezi kalmodulinem a jeho vazebnými partnery rovněž závislá na počtu vázaných kalciových iontů (Dagher *et al.*, 2011).



Obr. 2.5 Struktura kalmodulinu s rozlišením 1 Å. Modře jsou vyznačeny ionty vápníku. Páté vazebné místo vzniklo v důsledku krystalových kontaktů a není fyziologicky relevantní. PDB kód:1EXR (Wilson & Brunger, 2000).

Zajímavostí je i to, že afinita CaM k vápenatým iontům ($K_d \sim 10 \mu\text{M}$) je v klidovém stavu poměrně nízká, ale narůstá v přítomnosti cílového substrátu (Bayley *et al.*, 1996).

Funkční diverzita interakčních partnerů kalmodulinu a jeho schopnost zaujmout různé orientace je důkazem, že mechanismus regulace není jednotný (Hoeflich & Ikura, 2002; Tidow & Nissen, 2013). Například při studiu dynamiky apo-kalmodulinu v roztoku by zjištěno, že zaujímá podobnou sérii konformací jako v komplexu s MCLK kinasou (Gsponer *et al.*, 2008). Fundamentální otázkou ale zůstává interakce mezi CaMKK2 a CaM.

2.3.2 Ca²⁺/CaM-dependentní signální kaskády

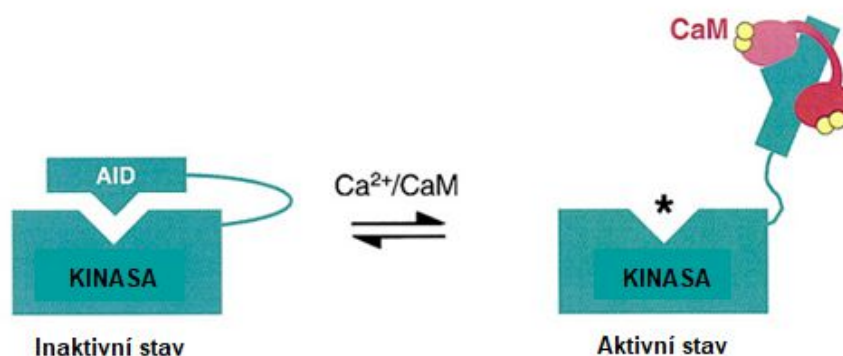
Členové CaMK rodiny se řadí mezi serin-threoninové kinasy, které rozeznávají konsenzuální motiv R-X-X-S/T. Jak jejich název napovídá, jejich aktivita je závislá na vazbě Ca²⁺/kalmodulinu, ačkoliv to není vždy pravidlem. Některé kinasy této rodiny vykazují i tzv. autonomní aktivitu podmíněnou jejich fosforylací na různých regulačních místech (Kennelly & Krebs, 1991; Pearson & Kemp, 1991; Swulius & Waxham, 2008).

Hovoříme-li o rodině CaM kinas, je příhodné je rozdělit na dvě separované skupiny. První z nich je skupina multifunkčních kinas, které v signální kaskádě aktivují celou řadu dalších efektorů. Druhé z nich jsou tzv. specifické CaM kinasy, které mají jediný cílový substrát. Mezi specifické kinasy patří např. CaMK3 nebo MLCK (z angl. **M**ynosin **L**ight **C**hain **K**inase). Zatímco multifunkční kinasy svojí rolí ovlivňují celkový osud buňky nebo tkáně, specifické kinasy mají konkrétní funkci v rámci buňky. Rozdíly v typických konsenzuálních motivech a strukturní difference v rámci konzervovaných oblastí jsou příčinou této substrátové specifity (Kennelly & Krebs, 1991; Pearson & Kemp, 1991).

Bez ohledu na potenciálně odlišné mechanismy aktivace, všechny kinasy sdílí vysoké procento sekvenční homologie a základní strukturní znaky s PKA. Katalytická doména se typicky skládá ze dvou laloků, na ní navazuje autoinhibiční segment (AID – z angl. **A**uto **I**nhibitory **D**omain) a doména vázající Ca²⁺-kalmodulin (CBD – z angl. **C**almodulin **B**inding **D**omain) (Tokumitsu *et al.*, 1997). Při bazálních hladinách vápenatých iontů zůstávají CaMK v inaktivním stavu díky dalším mechanismům autoinhibice v rámci N-koncové regulační domény. Mechanismus autoinhibice může fungovat dvojím způsobem, buď pozměňovat strukturu aktivního centra nebo intrastérickým mechanismem blokovat vazbu substrátu (Kobe & Kemp, 1999). Vše

nasvědčuje tomu, že CaMK využívají obou strategií Kennelly & Krebs, 1991; Pearson & Kemp, 1991). Uvolnění autoinhibičního segmentu je pravděpodobně doprovázeno sekundární reorganizací v aktivním centru, neboť mutace alaninu v blízkosti aktivační smyčky způsobila totální insenzitivitu vůči $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (O'Brien *et al.*, 2017). Obecné schéma aktivace CaMK vazbou Ca^{2+} /kalmodulinu je uvedeno na obr. 2.6.

Rodina multifunkčních kinas Ca^{2+} /kalmodulin dependentní kaskády zahrnuje CaMKI, CaMKII, CaMKIV a jejich aktivátory ze skupin CaMKK. Výskyt jednotlivých zástupců CaMK je specifický v rámci buněčné lokalizace i tkáňově. Rozsah působení CaMK je velmi široký, od regulace genové transkripce, přes apoptosu až po účast na rozvoji kognitivních funkcí (Swulius & Waxham, 2008).



Obr. 2.6 Obecný mechanismus aktivace CaMK kinas na základě uvolnění autoinhibičního segmentu (AID) vazbou kalmodulinu. V inaktivním stavu je aktivní místo stéricky chráněno autoinhibičním segmentem, který brání vazbě substrátu. Při vazbě Ca^{2+} /kalmodulinu dochází k uvolnění AID a aktivaci kinasy (Hoeflich & Ikura, 2002).

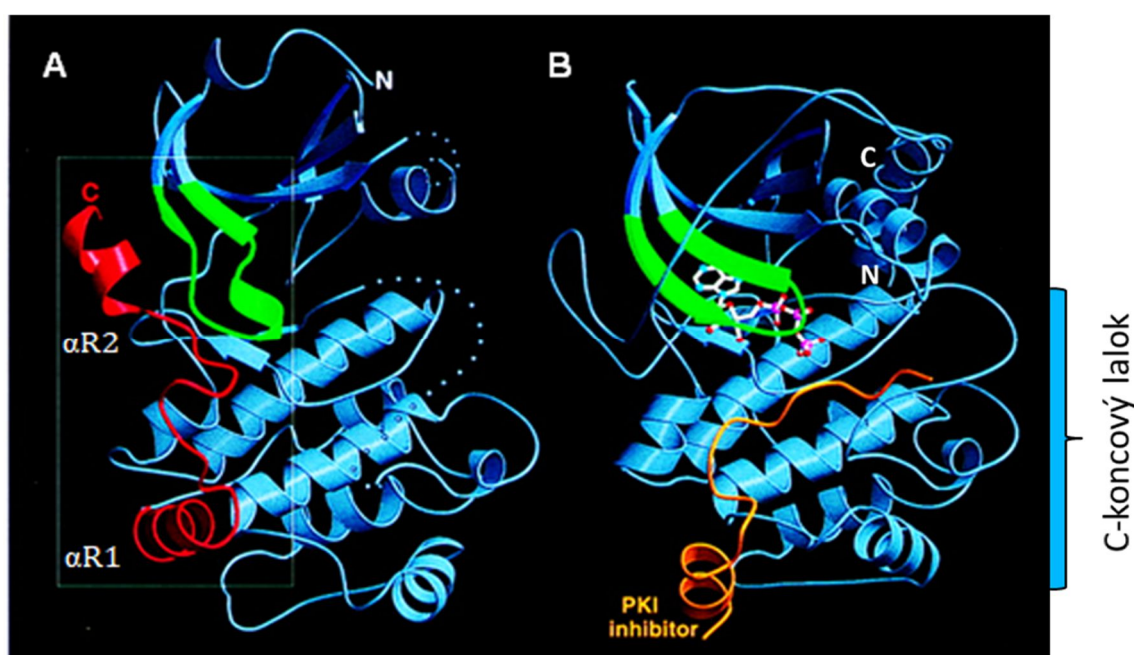
2.3.3 CaM kinasy (CaMK)

CaM kinasy zahrnují skupinu kinas CaMKI, CaMKIV a CaMKII. Zatímco CaMKI je široce rozšířena v cytosolu mnoha tkání, CaMKIV se převážně nachází v jádře buněk nervové tkáně, pohlavních orgánů a T-lymfocytů (Soderling, 1999). CaMKII je z důvodu její vysoké koncentrace v mozkové tkáni atraktivním cílem v oblasti neurologie (Yamauchi, 2005). Její význam spočívá ve fosforylaci iontových kanálů v závislosti na fluktuaci intracelulárního Ca^{2+} signálu. CaMKII se od ostatních CaM kinas odlišuje i schopností vytvářet velké oligomery (dodekamery), ve kterých se

katalytické domény nachází v těsném kontaktu pro urychlení autoaktivace (Rellos *et al.*, 2010; Chao *et al.*, 2011).

Specifikem kinas CaMK je nutnost vazby Ca^{2+} -CaM pro zpřístupnění fosforylačních míst v rámci aktivačního segmentu (Matsushita & Nairn, 1998; Haribabu *et al.*, 1995). Podnícení další aktivity je spojené s jejich fosforylací prostřednictvím primárních článků kaskády, tedy CaMKK1 a CaMKK2 (Kitani *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1998).

V případě CaMKIV je nezbytným předpokladem pro aktivaci autofosforylace v rámci N-koncového regulačního segmentu, což dokládá jeho autoinhibiční funkci (Okuno *et al.*, 1995; Chatila *et al.*, 1996). Zároveň ihned po aktivaci CaMKIV dochází k autofosforylaci Ser³³² v kalmodulin vazebné doméně, což zabraňuje další vazbě Ca^{2+} -CaM (Watanabe *et al.*, 1996).



Obr. 2.7 Srovnání struktury potkaní CaMKI (A) a PKA (B). Obě struktury mají helikální C-terminální lalok v podobné orientaci pro porovnání. Autoinhibiční segment (helix-smyčka-helix) včetně kalmodulin vazebné domény (285-316) je vyznačen červeně u CaMKI. P-smyčka vázající ATP (23-36 u CaMKI, 46-59 u PKA) je vyznačena zeleně. Neuspořádané strukturní oblasti jsou vyznačeny tečkovanými liniemi (převzato a upraveno z Goldberg *et al.*, 1996).

CaMKIV vykazuje i tzv. Ca^{2+} -nezávislou autonomní aktivitu, jejímž iniciátorem je fosforylace Thr¹⁹⁶. Tento regulační mechanismus je pravděpodobně nezbytný

k přenosu signálu do jádra buněk (Selbert *et al.*, 1995). Analogickým způsobem, tedy autofosforylací Thr²⁸⁶, je podpořena i aktivita CaMKII v hipokampu (Soderling, 1996; Giese *et al.*, 1998).

Na základě první krystalové struktury CaMKI je zřejmé že katalytická doména zaujímá kanonickou architekturu s dvěma laloky a linkerem, vytvářejícím katalytické místo. Autoinhibiční segment CaMKI (červeně, obr. 2.7, str. 27) pojímá dva helixy $\alpha R1$ a $\alpha R2$, které interagují prostřednictvím převážně hydrofobních interakcí s oběma laloky katalytické domény, čímž brání vazbě Mg^{2+} -ATP i substrátu (Goldberg *et al.*, 1996). Vazba Ca^{2+} /CaM na $\alpha R2$ naruší zmíněnou interakci s jedním z těchto laloků a zpřístupní vazbu ATP na základě změny konformace (Matsushita & Nairn, 1998). Konformační změna je přenesena i na helix $\alpha R1$, což vede k úplné aktivaci CaMK. Autoinhibiční segment fyzicky chrání katalytické centrum skrze interakci s P-smyčkou CaMK, čímž mění konformaci ATP-vazebného místa. Na obr. 2.7 je srovnání autoinhibovaného stavu CaMKI s PKA v komplexu s PKI inhibitorem.

Další substráty CaMK

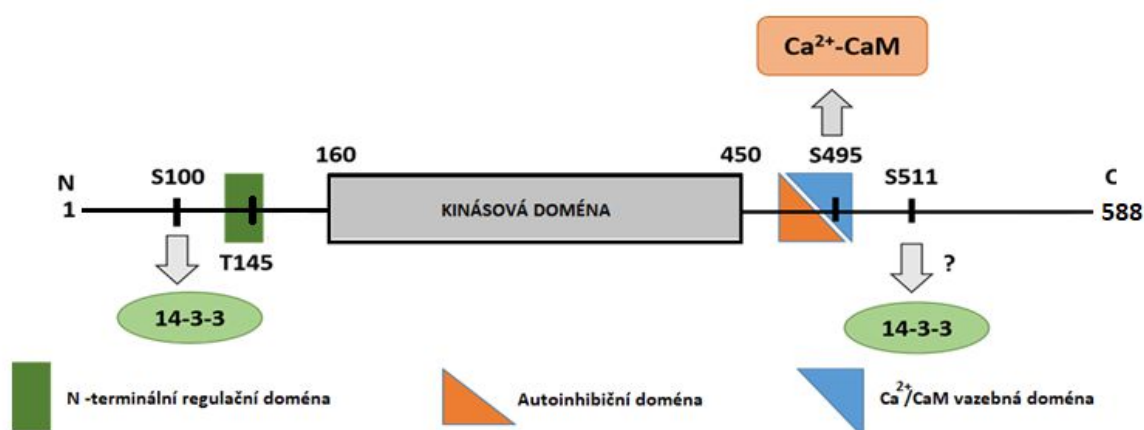
CaMKI je kritická pro dlouhodobou potenciaci, utváření synapsí a axonů v hipokampu prostřednictvím aktivace ERK (Davare *et al.*, 2009). CaMKI se rovněž podílí na exportu histondeacetylasy 5 z jádra a tím ovlivňuje vývoj kosterního svalstva (McKinsey *et al.*, 2000). Mezi další substráty patří synapsin 1 a 2 a nedávno identifikovaný placentální transkripční faktor GCM1 (Nairn & Greengard, 1987; Chang *et al.*, 2013). Jedním z dalších možných efektorů je transkripční faktor CREB, kterého CaMKIV a PKA fosforyluje na Ser¹³³ (Enslen *et al.*, 1994). Další studie také potvrdily, že CaMKIV fosforyluje i CREB-vazebný protein, což je aktivátor mnoha dalších transkripčních faktorů (Chawla, 1998). Zmíněné regulační procesy potvrzují rozsáhlý vliv Ca^{2+} -stimulace na regulaci exprese genů.

2.3.4 CaM kinasy kinasy (CaMKK)

CaMKK patří k předním zástupcům této signální kaskády, které specificky fosforylují threonin v rámci aktivační smyčky svých substrátů, CaMKI (Thr¹⁷⁷) a CaMKIV (Thr²⁰⁰) a zvyšují tak jejich katalytickou aktivitu. CaMKK2 rovněž specificky reguluje AMP-aktivovanou protein kinasu (AMPK), jíž se přisuzuje role

v energetickém metabolismu a při rozvoji obezity (Hawley *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2008). Funkce CaMKK2 je však spjata s řadou dalších procesů jako např. regulace glukózy, zánět, karcinogeneze a vývoj neurologických poruch (Racioppi & Means, 2012). Proto se o ní hovoří jako o možném cíli terapeutického zásahu. Jedná se však o úkol dosti náročný i vzhledem k její rozsáhlé tkáňové distribuci. V určitých tkáních může být regulace jedním či druhým směrem fatální pro vývoj v jiné oblasti organismu. Zvýšení aktivity CaMKK2 je spojeno s karcinogenezí a naopak její pokles může vést k bipolární poruše nebo schizofrenii (O'Brien *et al.*, 2017).

Dvě isoformy CaMKK (CaMKK1 a CaMKK2) byly v dominantním množství objeveny v savčím mozku (Haribabu *et al.*, 1995). Podobně jako ostatní zástupci CaMK rodiny CaMKK obsahují centrální Ser/Thr kinasovou doménu, na kterou navazuje regulační doména (472-500 u CaMKK2), která pojímá autoinhibiční segment s kalmodulin vazebnou doménou (AID-CBD) (Kukimoto-Niino *et al.*, 2011a). Aktivační segment představuje úsek sekvence 330-357 (viz obr. 2.8, obr. 2.9, str. 30).

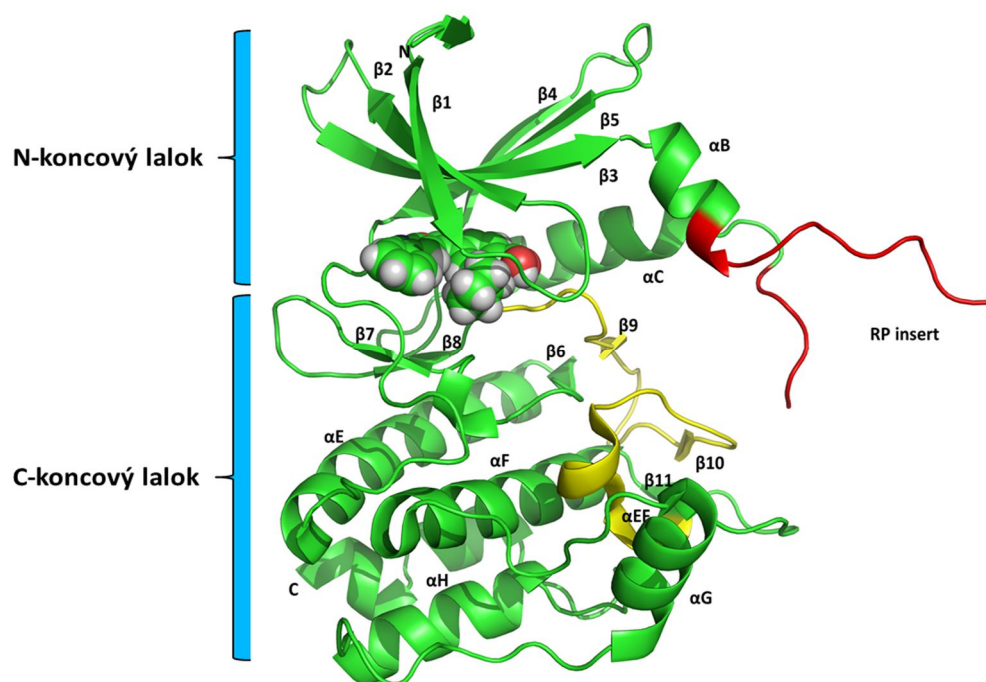


Obr. 2.8 Schéma struktury CaMKK2. V obrázku jsou vyznačeny důležité regulační prvky její struktury: N-terminální regulační segment, nezbytný pro autonomní aktivitu CaMKK2 (zelená), kinasová doména (šedá). C-koncový regulační segment zahrnující autoinhibiční doménu (oranžová) a CaM vazebnou sekvenci (modrá) blokuje vazbu substrátu nebo ovlivňuje strukturu katalytického místa při nízkých koncentracích vápníku. Důležitá regulační fosforylační místa: S100 a S511 – potenciální místa pro vazbu 14-3-3; T145 – regulace aktivity CaMKK; S495 – regulace vazby Ca²⁺/kalmodulinu.

Přestože CaMKK1 a CaMKK2 sdílí velké procento sekvenční homologie, jejich biochemické vlastnosti jsou odlišné. Aktivita CaMKK1 je přísně regulována

prostřednictvím vazby $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ a fosforylací aktivační smyčky (Tokumitsu *et al.*, 2000). Oproti tomu regulace CaMKK2 je spjata s fosforylací na různých místech molekuly, což rozhoduje o její autonomní aktivitě i v nepřítomnosti Ca^{2+} stimulace (Anderson *et al.*, 1998).

Hlavní úlohu v autonomní aktivitě hraje flexibilita a fosforylační status N-koncové regulační domény (129-151 u potkaní CaMKK2), jehož delece zapříčinila kompletní závislost na regulaci pomocí vazby Ca^{2+} -kalmodulinu (Tokumitsu *et al.*, 2001). V tomto ohledu hraje klíčovou roli sekvenční fosforylace proteinu na pozicích Ser¹²⁹, Ser¹³³ a Ser¹³⁷ (v rámci N-koncové regulační domény – obr. 2.8, str. 29). Fosforylaci těchto míst zajišťují dvě kinasy, GSK3 a CDK5, které fungují recipročně. Všechna tři místa jsou konstitutivně fosforylována za klidových podmínek u savců, což vede k potlačení autonomní aktivity CaMKK a možnost aktivace pouze skrze vazbu Ca^{2+} -CaM (Green *et al.*, 2011).



Obr. 2.9 Krystalová struktura kinasové domény CaMKK2 s inhibítozem 8R4. Žlutě je vyznačen aktivační segment (330-357). Struktura neobsahuje celou sekvenci RP insertu z důvodu zvýšené mobility v této oblasti. PDB kód: 5UY6.

V rámci N-koncové domény se ještě nachází důležité autofosforylační místo Thr⁸⁵. K fosforylaci tohoto místa dochází bezprostředně po transientní stimulaci

Ca²⁺/kalmodulinem, čímž si CaMKK2 dlouhodobě udržuje bazální hladinu aktivity, nezbytnou pro její fungování v mozkové tkáni (Scott *et al.*, 2015). V blízkosti těchto fosforylačních míst se vyskytují vzácné bodové mutace, které jsou pravděpodobně zodpovědné za zvýšenou genetickou susceptibilitu vůči mnoha onemocněním (O'Brien *et al.*, 2017).

Aktivita CaMKK je dále modulována fosforylací na různých místech molekuly prostřednictvím c-AMP dependentní protein kinasy PKA (Wayman *et al.*, 1997; Okuno *et al.*, 2001; Matsushita & Nairn, 1999). CaMKK1 obsahuje pět PKA fosforylačních míst (Ser⁵², Ser⁷⁴, Thr¹⁰⁸, Ser⁴⁵⁸ a Ser⁴⁷⁵), přičemž poslední čtyři z nich mají svá analoga u CaMKK2 (Ser¹⁰⁰, Thr¹⁴⁵, Ser⁴⁹⁵, a Ser⁵¹¹). Fosforylace Ser⁴⁵⁸ blokuje vazbu Ca²⁺-CaM a fosforylace Thr¹⁰⁸ ovlivňuje aktivitu CaMKK vzhledem k substrátům CaMKI a CaMKIV (Kitani *et al.*, 2001; Wayman *et al.*, 1997). V nedávné studii bylo zjištěno, že AMPK zajišťuje zpětnou fosforylaci CaMKK2 v regulačním místě Thr¹⁴⁵ (u potkaní formy Thr¹⁴⁴), čímž blokuje její autonomní aktivitu a ponechává CaMKK2 opět závislou na aktivaci vazbou Ca²⁺/kalmodulinu. Stabilizace inaktivní konformace je patrně zprostředkována interakcí mezi C-terminální regulační oblastí (včetně AID) a N-terminální regulační doménou, která hraje důležitou roli v autonomní aktivitě (Nakanishi *et al.*, 2017; Tokumitsu *et al.*, 2001).

Kinasová doména CaMKK vykazuje zajímavé strukturní odlišnosti ve srovnání s ostatními CaM kinasami. Za prvé, obsahuje flexibilní úsek bohatý na aminokyseliny Arg a Pro a Gly, zvaný RP insert (204-226). Pro mnoho kinas je při rozpoznávání substrátu rozhodující konsenzuální sekvence, ale v případě CaMKK tuto činnost pravděpodobně nahrazuje RP úsek. Jeho delece způsobila kompletní ztrátu aktivační schopnosti CaMKK vzhledem k CaMKI i CaMKIV (Tokumitsu *et al.*, 1999).

Navíc z krystalové struktury CaMKK2 vyplývá, že C-koncový lalok postrádá helix α D, který se nachází u CaMKI i CaMKII a interaguje s AID. Namísto tohoto úseku se zde nachází smyčka β 5- α E, která definuje hydrofóbní povrch důležitý pro vazbu substrátu (Kukimoto-Niino *et al.*, 2011a). Tyto strukturní rozdíly, spolu s odlišnou délkou a sekvencí AID nás přivádí k myšlence, že interakce mezi CaMKK2 katalytickou doménou a AID může být odlišná.

2.3.5 Proteiny 14-3-3

Proteiny 14-3-3 patří do vysoce konzervované rodiny kyselých dimerních proteinů o velikosti 30 kDa (Liu *et al.*, 1995). Tyto proteiny byly poprvé identifikovány v roce 1967 při izolaci savčího mozku, kde byly dominantně zastoupeny v cytosolu. Jejich název je odvozený podle pořadí frakce při dvoudimensionální DEAE celulosové chromatografii a pozice migrace na škrobové elektroforéze (Moore & Perez, 1967).

Doposud je známo sedm savších isoform (β,γ,ε,σ,τ,ζ,η) (Rosenquist, 2001; Wang & Shakes, 1996) a dvě kvasničné isoformy Bmh1 a Bmh2 (van Heusden & Yde Steensma, 2006). Postupem času byly další isoformy nalezeny i v jiných eukaryotických organismech, včetně odlišných druhů rostlin, kde bylo nalezeno až 15 různých genů kódujících 14-3-3 (Rosenquist, 2001).

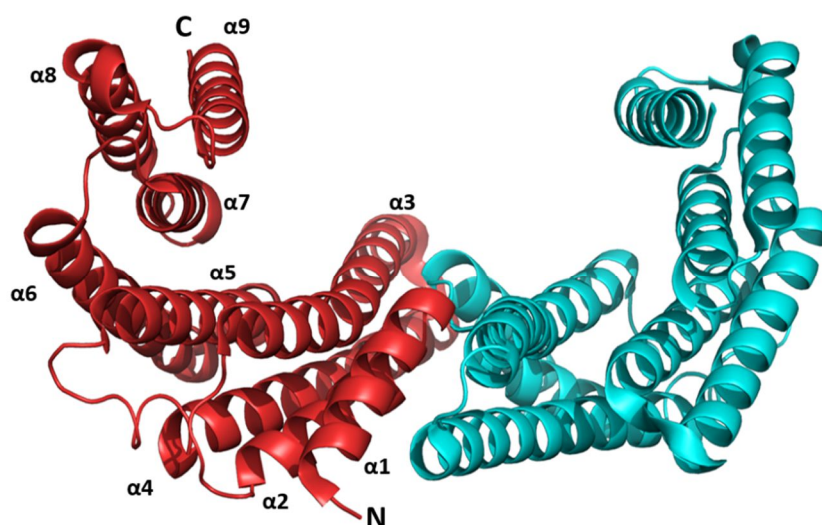
Prvotní studie vyvolaly dojem, že tyto proteiny jsou hojně zastoupené především v nervové tkáni. Postupně bylo zjištěno, že jejich tkáňová distribuce je velmi rozsáhlá, ale že některé isoformy jsou tkáňově specifické (Aitken *et al.*, 1992). Isoforma τ byla v dominantním množství nalezena v T-buňkách imunitního systému a isoforma σ (SFN/stratifin) v buňkách epitelu (Leffers *et al.*, 1993; Nielsen, 1991).

Vysoký počet vazebných partnerů (stovky a více) a jejich funkční diverzita svědčí o tom, že proteiny 14-3-3 ovlivňují širokou škálu buněčných procesů, např. mitogenezi, kontrolu buněčného cyklu, regulaci transkripce nebo apoptosu (Masters & Fu, 2001; Rubio *et al.*, 2004).

Struktura proteinů 14-3-3

Všechny isoformy s výjimkou σ vytváří homo nebo heterodimery (Gardino *et al.*, 2006; Wilker *et al.*, 2005). První krystalografické studie odhalily, že struktura isoformy ζ i τ se skládá z devíti anti-paralelních helixů (α1 - α9) (viz obr. 2.10, str. 33). Dimer formuje centrální kanál (s rozsahem ~35 Å a hloubkou ~20 Å), který obsahuje dva amfipatické ligand-vazebné žlábkové lemované helixy α3, α5, α7 a α9 (Liu *et al.*, 1995; Xiao *et al.*, 1995). Přestože jednotlivé isoformy sdílí vysoké procento sekvenční homologie a existují mezi nimi minimální strukturní alterace, liší se např. vzájemnou pozicí monomerů v důsledku rozdílného úhlu mezi oběma podjednotkami. Právě tato unikátní vlastnost umožňuje proteinům 14-3-3 vázat ligandy různých tvarů

a velikostí (Yang *et al.*, 2006). Maximální sekvenční variabilita jednotlivých isoform se vyskytuje na C-konci proteinu. Přestože všechny známé krystalové struktury proteinů 14-3-3 tento úsek postrádají, hovoří se o jeho potenciální lokaci v ligand-vazebném žlábků. FRET a simulace molekulární dynamiky poukazují na schopnost vytěsnit tento segment při vazbě fosfopeptidu (Obsilova *et al.*, 2004; Silhan *et al.*, 2004). Zároveň odstranění tohoto úseku o délce 15-40 aminokyselin vedlo ke zvýšení vazebné afinity 14-3-3 ζ vůči testovaným ligandům (Obsilova *et al.*, 2004; Truong *et al.*, 2002).



Obr. 2.10 Krystalová struktura dimeru 14-3-3 γ . Každý protomer je zobrazen odlišnou barvou. PDB kód: 2B05 (Papagrigoriou *et al.*, 2005).

Z toho vyplývá, že C-koncová oblast hraje významnou roli v regulaci interakčních schopností různých isoform 14-3-3 (Obsilova *et al.*, 2004; Silhan *et al.*, 2004; Truong *et al.*, 2002).

Vazba ligandů

Specifikace těchto proteinů spočívá v rozpoznávání konsenzuálních vazebných motivů obsahující fosfoseriny nebo fosfothreoniny (Muslin *et al.*, 1996). Prozatím byly identifikovány tři nejčastější vazebné motivy:

Typ I: R[S/ Φ][+]pSXP

Typ II: RX[Φ /S][+]pSXP

Typ III: pS-X₁₋₂-COOH,

kde pS představuje fosfoserin (případně fosfothreonin), Φ je aromatická aminokyselina, + je bazická aminokyselina a X je jakýkoliv typ aminokyseliny. (Rittinger *et al.*, 1999; Yaffe, 2002). Neomezená škála vazebných ligandů 14-3-3 je důkazem, že proteiny 14-3-3 rozpoznávají i nefosforylované motivy a různé další sekvence (Masters *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Na základě těchto vlastností je zřejmé, že proteiny 14-3-3 mají i afinitu k vazbě ATP a dokonce mírnou vnitřní ATP-asovou aktivitu (Ramteke *et al.*, 2014).

Z krystalových struktur fosfopeptidů v komplexu s proteinem 14-3-3 vyplývá, že apo-struktura se významně strukturně neliší od proteinu v komplexu. Fosfátová skupina peptidu je stabilizována aminokyselinovými zbytky tvořící kladně nabitý povrch vazebného žlábků (konkrétně: Lys⁴⁹, Arg⁵⁶, Arg¹²⁷ a Tyr¹²⁸). Tyto struktury rovněž vysvětlují selektivitu vazebných motivů typu I a II. Na pozici pSer +2 se nachází prolin, který umožňuje prudkou změnou průběhu řetězce peptidu. Přestože podobnou funkci by mohl na této pozici plnit i glycin, ukázalo se, že takové peptidy jsou vázány s mizivou afinitou (Yaffe *et al.*, 1997). Poslední typ motivu patří k méně častým a tyto interakce jsou většinou doprovázeny nízkou vazebnou afinitou. Nicméně tento C-koncový motiv umožňuje vazbu nízkomolekulárních molekul, které vyplní volný prostor vazebného žlábků a tak interakci stabilizují. Jedním ze známých stabilizačních agens proteinových komplexů se 14-3-3 je fytotoxin fusiccocin (Würtele *et al.*, 2003). Na základě stabilizace komplexu proteinu 14-3-3 a regulátoru stresové odpovědi GCN1 se v nedávné době podařilo obnovit růst nervových axonů *in vitro* s potenciálním využitím při regeneraci centrálního nervového systému (Kaplan *et al.*, 2017).

Strukturní funkce proteinů 14-3-3

Dlouhodobé studie proteinů 14-3-3 poukázaly na jejich rozmanité funkce v buněčném metabolismu. Na základě těchto poznatků lze klasifikovat tři hlavní regulační mechanismy proteinů 14-3-3:

1) *Přímá konformační změna vazebného partnera.* 14-3-3 proteiny představují velmi rigidní platformu, která může pozměnit strukturu svých interakčních partnerů.

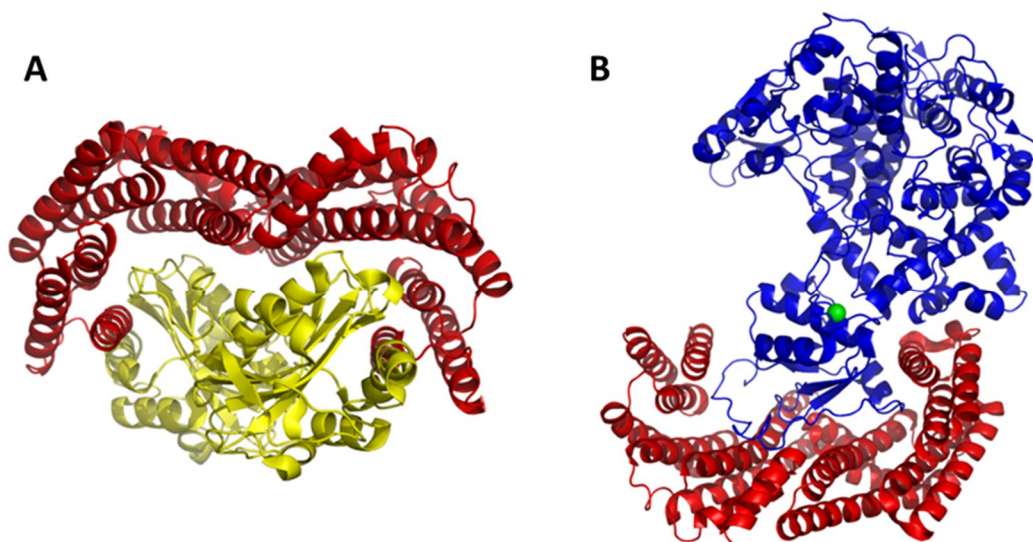
(Yaffe, 2002). Jedním z příkladů je např. regulace serotonin-N-acetyltransferasy (AANAT), jejíž komplex se 14-3-3 patří mezi první obeznámené struktury (Obsil *et al.*, 2001). Afinita toho enzymu vůči serotoninu je poměrně nízká a vzrůstá až po fosforylaci a vazbě proteinu 14-3-3. Z krystalové struktury vyplývá, že AANAT je pevně ukotvena v centrálním kanálu skrze rozsáhlou síť vazeb, jímž dominují interakce s oběma ligand-vazebnými žlábkami (obr. 2.11 A, str. 36). Vazba 14-3-3 v tomto případě indukuje konformační změny katalytického centra pro optimální vazbu substrátu (Obsil *et al.*, 2001; Ganguly *et al.*, 2001). Mezi další příklady regulace enzymové aktivity patří regulace kvasničného enzymu neutrální trehalasy (Nth1), jehož struktura s kvasničným proteinem 14-3-3 byla nedávno objasněna v naší laboratoři (viz obr. 2.11 B, Alblova *et al.*, 2017).

2) *Maskování signalizačních sekvencí molekuly.* Proteiny 14-3-3 mohou fyzicky chránit některé signální sekvence nebo postranlační modifikace proteinů určující jejich subcelulární lokalizaci. Jako příklad lze zmínit rodinu transkripčních faktorů FOXO (z angl. **F**orkhead-**o**x transcription factor **O**). Proteiny 14-3-3 ovlivňují buněčnou lokalizaci FOXO v závislosti na maskování jejich jaderné signální sekvence. Ve srovnání s předchozím případem se však zdá, že dimer 14-3-3 pouze stéricky chrání DNA vazebné rozhraní, aniž by způsoboval rozsáhlejší konformační změny proteinu FOXO4 (Obsil *et al.*, 2003; Silhan *et al.*, 2009).

3) *Adaptorová funkce.* Dimerní struktura proteinů 14-3-3 nás nabádá k myšlence, že tyto proteiny mohou fungovat i jako adaptorové proteiny. Každý z protomerů váže dvě proteinové molekuly tak, aby se dostaly do vzájemné proximity za účelem tvorby komplexu a jejich aktivace. Příkladem může být stabilizace tetrameru p53 skrze vazbu 14-3-3 do místa v nestrukturované oblasti nebo tvorba ternárního komplexu mezi β -kateninem a nukleárním proteinem Chibby (Waterman *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2003; Takemaru *et al.*, 2009). V neposlední řadě lze zmínit funkci 14-3-3 v regulaci florigenu Hd3a, který napomáhá jeho translokaci do jádra a tvorbě ternárního komplexu s (Os)FD1 transkripčním faktorem (Taoka *et al.*, 2011).

Z krystalových struktur komplexů AANAT a Nth1 se 14-3-3 proteiny je zřejmé, že vazebné stechiometrie a interakční povrch mezi proteiny je rozmanitý (viz obr.

2.11). Navzdory velkému počtu vazebných partnerů se prozatím podařilo získat jen 4 struktury s vysokým rozlišením (Obsil *et al.*, 2001; Ottmann *et al.*, 2007; Taoka *et al.*, 2011; Alblova *et al.*, 2017).



Obr. 2.11 A – Krystalová struktura dimeru 14-3-3ζ (červeně) se dvěma molekulami AANAT (žlutě) v centrálním kanálu. PDB kód: 1IB1 (Obsil *et al.*, 2001). **B** – Krystalová struktura komplexu neutrální trehalázy 1 (modře) s kvasničným Bmh1 (červeně) s vazebnou stechiometrií Nth1:Bmh1 1:2. Zeleně je vyznačen ion Ca^{2+} ve vápník-vazající doméně. PDB kód: 5N6N (Alblova *et al.*, 2017).

Problémy s krystalizací těchto komplexů patrně tkví i v tom, že velká část interakčních partnerů obsahuje velké množství nestrukturovaných oblastí nebo se jedná o nízkoafinitní komplexy, jejichž interakce jsou velmi dynamické. Naštěstí v těchto případech využíváme komplementárních technik (např. SAXS, H/D výměna, kryo-EM), které nám pomáhají alespoň částečně odhalovat stále nové regulační mechanismy těchto všestranných proteinů.

2.3.6 Interakce mezi CaMKK a proteinem 14-3-3

Aktivita CaMKK2 je přímo modulována prostřednictvím fosforylace na různých místech molekuly. Tento efekt může být ještě více posílen interakcí s proteinem 14-3-3. V rámci interakce CaMKK1 se 14-3-3 byly identifikovány dva

potenciální konzervované motivy pro vazbu 14-3-3, Ser⁷⁴ (Ser¹⁰⁰ u CaMKK2) a Ser⁴⁷⁵ (Ser⁵¹¹ u CaMKK2). Ze studií však vyplývá, že Ser⁴⁷⁵ je možné fosforylovat jen parciálně a pouze v přítomnosti Ca²⁺/kalmodulinu (Davare *et al.*, 2004; Okuno *et al.*, 2001). Vazba proteinu 14-3-3 může regulovat CaMKK dvojím mechanismem. Protein 14-3-3 může chránit regulační fosforylační místo (Thr¹⁰⁸) před defosforylací, což udržuje kinasu v jejím inhibovaném stavu (Davare *et al.*, 2004). Ichimura *et al.* naznačil, že inhibiční mechanismus může být založen i na snížení maximální rychlosti enzymatické reakce (V_{\max}) CaMKK1 (Ichimura *et al.*, 2008). Cílem našeho výzkumu je ověřit, zda CaMKK2 využívá podobné nebo kompletně odlišné regulační mechanismy při vazbě proteinů 14-3-3.

2.3.7 Interakce mezi CAMK a Ca²⁺/CaM

Mechanismy regulace různých kinas skrze vazbu kalmodulinu jsou poměrně rozmanité. Vazebné motivy kalmodulinu jsou často klasifikovány na základě vzdálenosti hydrofóbních reziduí peptidu účastnících se vazby. Na základě toho rozlišujeme např. 1-14, 1-5-10 nebo 1-17 vazebné motivy, které dokládají pestrost mechanismů interakce mezi kalmodulinem a jeho substráty (Tidow & Nissen, 2013; Osawa *et al.*, 1999). Mechanismus aktivace, při kterém se globulární domény kalmodulinu ovinou kolem AID a naruší tím interakci mezi AID a kinasovou doménou byl pozorován např. mezi CaMKII a CaM. Vazba kalmodulinu na autoregulační segment CaMKII (296-316) indukuje nový helix na C-konci, který je pevně ponořen v hydrofóbní kavitě struktury Ca²⁺/CaM (Rellos *et al.*, 2010).

Způsob regulace, ve kterém dochází k přímým kontaktům s kinasovou doménou byl pozorován zatím u jediné kinasy, DAPK. V tomto případě molekula kalmodulinu zaujímá otevřenější konformaci, kde obě globulární domény interagují s kinasovou doménou a snižují tak přístupnost aktivního centra. Tato struktura se odlišuje i od krystalové struktury peptidu autoregulační domény DAPK s kalmodulinem, která zaujímá mnohem kompaktnější tvar (de Diego *et al.*, 2010). Z toho je zřejmé, že kompaktní struktura s peptidem není fyziologicky relevantní, neboť při interakci s intaktním proteinem dochází k dalším sterickým bráněním s molekulou kalmodulinu. NMR struktura komplexu peptidové sekvence CaMKK1 CBD s kalmodulinem (Osawa *et al.*, 1999) rovněž potvrzuje, že orientace peptidu vůči

globulárním doménám kalmodulinu je jiná než v případě MCLK a CaMKII (Ikura *et al.*, 1992; Meador *et al.*, 1992; Rellos *et al.*, 2010). Vazebný peptid zaujímá vůči kalmodulinu nezvyklou paralelní orientaci (neboli N-konec kalmodulinu a peptidu ve vzájemné interakci). Struktura tohoto komplexu rovněž vypovídá o unikátní pozici klíčových hydrofóbních aminokyselinových zbytků peptidu, které jsou vzájemně separovány počtem 14 reziduí (Osawa *et al.*, 1999).

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce disertační práce bylo studium regulačních mechanismů dvou důležitých proteinkin, ASK1 a CaMKK2. V rámci projektu ASK1 bylo naším hlavním cílem pochopení její regulace prostřednictvím thioredoxinu v redukčním prostředí a při oxidativním stresu. Vzhledem k nedostatku strukturních informací ohledně thioredoxin-vazebné domény bylo dalším záměrem i její strukturní charakterizace. V rámci projektu CaMKK2 nás zajímala především identifikace vazebných oblastí proteinu 14-3-3 a mechanismus inhibice. Z dosavadních studií ostatních CaMK jsme získali další podněty pro studium mechanismu aktivace CaMKK2 prostřednictvím Ca^{2+} /kalmodulinu. Konkrétní cíle byly následující:

Proteinkinasa ASK1 a TRX1

- 1) Příprava thioredoxin-vazebné domény ASK1 ve stabilní a rozpustné formě
- 2) Biofyzikální charakterizace interakce ASK1 s TRX1 za redukujících a oxidujících podmínek s využitím cílené mutagenese
- 3) Mapování vazebného rozhraní komplexu
- 4) Strukturní charakterizace samotné domény i jejího komplexu s TRX1
- 5) Charakterizace oxidovaného stavu ASK1 a její role při interakci

Ca^{2+} /kalmodulin dependentní kinasa kinasa 2

- 1) Příprava konstruktů inaktivní CaMKK2 (zahrnující vazebná místa pro 14-3-3 γ i kalmodulin) v rozpustné a stabilní formě
- 2) Biofyzikální a strukturní charakterizace komplexu CaMKK2:14-3-3 γ
- 3) Úloha proteinu 14-3-3 při inhibici CaMKK2
- 4) Strukturní charakterizace komplexu CaMKK2: Ca^{2+} /kalmodulin
- 5) Návrh možného mechanismu inhibice a aktivace CaMKK2

4 METODY A MATERIÁL

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

1,4- dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Německo
β -merkптоethanol (β ME)	Sigma-Aldrich, USA
β -glycerolfosfát	Sigma-Aldrich, USA
agarosa GTQ	Carl Roth GmbH, Německo
ampicilin	Sigma-Aldrich, USA
akrylamid	Carl Roth GmbH, Německo
azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
bis-akrylamid	Carl Roth GmbH, Německo
bromfenolová modř	Carl Roth GmbH, Německo
Coomassie Brilliant blue R 250	LKB Bromma, Švédsko
dihydrát ethylendiamintetraoctanu	Lachema, s.r.o, ČR
disodného	
DNA oligonukleotidy	Generi Biotech, s.r.o., ČR
dodecylsírán sodný (SDS)	Carl Roth GmbH, Německo
DTNB	Sigma-Aldrich, USA
ethanol	PENTA - Ing. Petr Švec, ČR
fenylmethylsufonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH, Německo
formaldehyd	LACH-NER, s.r.o., Česká republika
GelRed	New England BioLabs, USA
Gene Ruler 1 kВ DNAladder	Fermentas, Kanada
glycerol	PENTA - Ing. Petr Švec, ČR
glycin	Carl Roth GmbH, Německo
guanidin-hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Německo
hexahydrát síranu nikelnatého	PENTA - Ing. Petr Švec, ČR
hydroxid sodný	LACH-NER, s.r.o., ČR
chloramfenikol	Sigma-Aldrich, USA

imidazol	Carl Roth GmbH, Německo
isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid	EMD Biosciences, Inc., Německo
kanamycin	Sigma-Aldrich, USA
isopropylalkohol	Genomed, Německo
kyselina boritá	LACH-NER, s.r.o., ČR
kyselina chlorovodíková	PENTA - Ing. Petr Švec, ČR
kyselina octová	PENTA - Ing. Petr Švec, ČR
Loading-Dye	New England BioLabs, USA
Luria-Bertani (LB) agar	Carl Roth GmbH, Německo
Luria-Bertani (LB) médium	Carl Roth GmbH, Německo
lysozym	SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
methanol	PENTA - Ing. Petr Švec, ČR
mix deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP)	Thermo Scientific, USA
peroxodisíran amonný (APS)	Sigma-Aldrich, USA
PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene, USA
PKA (c-AMP dependentní protein kinasa)	Promega, USA
Phe-sefaróza CL4B	Amersham Biosciences, USA
Phos-tag	Wako Pure Chemical Corp., Japan
PP1	Sigma-Aldrich, USA
restrikční enzymy	Fermentas, Kanada
Sypro Orange (5000x konc.)	Sigma-Aldrich, USA
tetraethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Německo
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Německo

4.1.2 Přístroje

15T solariX	Bruker Daltonics, Billerica, USA
3505 pH Meter	Nova Capital Ltd, UK
horizontální elektroforéza	Sigma-Aldrich, USA
centrifuge 5418	Eppendorf, Německo
elektrický vařič	Eta, Česká republika

excitační Ti:safírový laser	Chameleon Ultra II a Pulse Picker HP, Coherent
fotonásobič MCP-PMT	R3809U-50, Hamamatsu
FPLC- ÄKTA	Amersham Biosciences, Švédsko
Chirascan™-plus	Applied Photophysics, Velká Británie
J-810 spektropolarimetr	Jasco, Japonsko
laboratorní váhy HF-200g	And, USA
LightCycler 480 II	Roche Applied Science, Německo
Peristaltická pumpa	IDEX Health&Science SA, Švýcarsko
ProteomLab™ XL-I	(Beckman Coulter, USA)
Sigma 8K Floorstanding Refrigerated Centrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Německo
spektrofotometr Agilent 8453	Agilent Technologies, USA
Termoblok	Grant, UK
termocykler Mastercycler Personal	Eppendorf, Německo
termostat BT 120M	Laboratorní přístroje, ČR
transiluminátor UVT-14M	Herolab GmbH, Německo
třepačka Gallenkamp Orbital Incubator	Gemini BV, Holandsko
třepačka Multitron	Infors AG, Švýcarsko
Ultrasonic Processor	ColeFarmer, USA
vodní lázeň	Memmert GmbH, Německo
vertikální elektroforéza	Bio-Rad Laboratories, USA
vortex RX ³	Velp Scientifica, Itálie
zdroj napětí pro elektroforézu	Consort E143, Belgie
zařízení pro měření rozptylu světla	ALV GmbH, Německo

4.1.3 Ostatní materiál

automatické pipety	Eppendorf, Německo
dialyzační membrána (typ 27/32)	Carl Roth GmbH, Německo
Escherichia coli BL21(DE3)	Stratagene, USA
Escherichia coli DH5α(TOP10)	Stratagene, USA

Escherichia coli BL21 (DE3)	Stratagene, USA
filtry Spartan 13/0,45 RC	GE Healthcare, USA
filtry UG1 a BG40	Thorlabs
GeneJET Gel extraction kit	Thermo Scientific, Litva
GeneJET PCR purification kit	Thermo Scientific, Litva
GeneJET Plasmid Miniprep kit	Thermo Scientific, Litva
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, USA
kolona Hiloal 26/60 Superdex 75 pg	GE Healthcare, USA
kolona Superdex 200 (10/300 GL)	GE Healthcare, USA
kolona Superdex 75 Increase	GE Healthcare, USA
kolona pro afinitní chromatografii	Bio-Rad Laboratories, USA
kolona na reverzní fázi	Agilent technologies, USA
kolona Peptide Microtrap	Optimize technologies, USA
koncentrátory Amicon Ultra	EMD Millipore, USA
Zeba™ Spin Desalting Column	Thermo Scientific, Litva
křemenné kyvety	Lightpath Optical Ltd., UK Starna, USA
mikrozkumavky	Eppendorf, Německo
nylon mebrane filters 0,45 µm	GE Healthcare, USA
plasmid pET-15b	Novagen, USA
plasmid pRSFDuet-1	dar od Dr. Evžena Bouři, NIH, USA
plasmid pQE-30	dar od Katji Becker, Justus Liebig Universitat, Giessen, Německo
stříkačky	Chirana T. Injecta, a.s., Slovensko
plastové zkumavky	Carl Roth GmbH, Německo

V následující sekci se zaměřím na metody a přesný popis experimentů, které jsem prováděla osobně nebo se věnovala přípravě vzorků a vyhodnocování dat. V sekci výsledky budou okrajově zmíněny veškeré experimenty, které jsou součástí uvedených publikací a jsou nezbytné k objasnění vyplývajících skutečností.

4.2 Exprese a purifikace proteinů

Příprava proteinu *in vitro* pomocí rekombinantní exprese a následné purifikace zahrnuje několik dílčích etap. Obvyklá strategie je navržení více expresních konstruktů v podobě cirkulární plasmidové DNA, které jsou testovány za různých podmínek exprese (teplota, doba inkubace, typ bakterií). Následuje vhodně zvolená série chromatografií s cílem získat protein v optimálním množství a čistotě. Plasmidy se vzájemně liší fúzní značkou, která je potřebná jednak pro izolaci proteinu ze směsi všech bakteriálních proteinů, ale zároveň může pozitivně ovlivňovat stabilitu a rozpustnost proteinu v průběhu exprese i purifikace. Mezi další strukturní prvky určující typ plasmidu patří promotor, selekční marker pro antibiotikovou rezistenci a klonovací místo. Klonovací místo obsahuje řadu rozpoznávacích sekvencí pro tzv. restriční endonukleasy, jejichž schopností využíváme při vložení kýženého genu do daného vektoru. Jedná se o krátké palindromické sekvence, při jejichž štěpení dochází k tvorbě komplementárních přesahů.

Typ promotoru určuje míru exprese daného proteinu. V případě inducibilní exprese řízené T7 promotorem je syntéza T7 RNA polymerasy i proteinu aktivována až po vazbě isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) na lac represor v oblasti lac operátoru. Tento mechanismus brání předčasné výrobě proteinu při vysoké teplotě v masivním množství a jeho ukládání ve formě nerozpustných inkluzních tělísek. V některých případech je proto vhodné volit systém, který funguje na bazální expresi. Takové podmínky nabízí např. plasmid pST39, který se nachází v nízkém počtu kopií a před každým klonovacím místem je zabudována sekvence translačního enhanceru pro dosažení vysoké hladiny exprese. Pomalá exprese proteinu bez indukce prostřednictvím IPTG podporuje jeho správné sbalení a tedy i zvýšení celkového výtežku (Tan, 2001). V některých případech je inducibilní exprese zajištěna kultivací ve speciálních autoindukčních médiích. V médiu se vyskytuje takový poměr laktosy a glukosy, aby bakterie začaly využívat laktosu až v určité fázi růstového cyklu, zpravidla již při snížené teplotě, vhodné pro expresi proteinu (Studier, 2005).

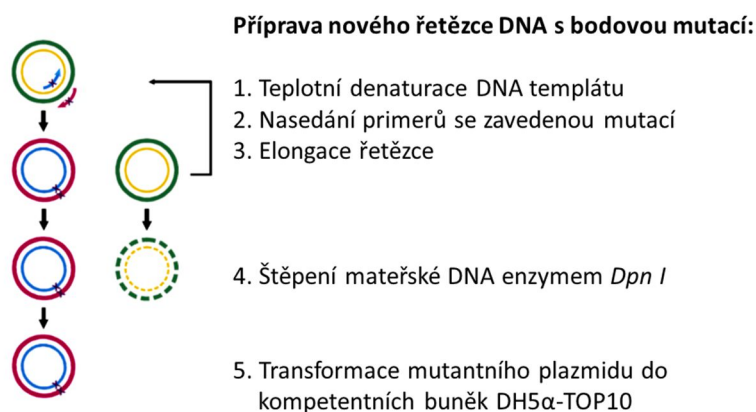
Amplifikace genového úseku DNA obsahujících na koncích vybraná restriční místa byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce. Produkty PCR byly následně analyzovány pomocí horizontální agarózové elektroforézy a přečištěny

pomocí gravitačních kolon. Sekvence těchto úseků i cílového vektoru bylo nutné štěpit odpovídajícími restrikčními endonukleasami. Linearizovaný plasmid i štěpený PCR úsek byly separovány pomocí DNA elektroforézy a zóny odpovídající velikosti byly z gelu extrahovány. Následně proběhlo jejich přečištění prostřednictvím komerčně dostupných kitů. Připravené produkty obsahující komplementární úseky restrikčních míst byly inkubovány v prostředí enzymu T4 ligasy, který katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby a vznik rekombinantního plasmidu. Výsledné vektory byly přenesy do bakterií *E. coli* DH5 α -TOP10 pomocí transformace teplotním šokem. Kultury byly inkubovány přes noc v LB médiu při 37 °C a z nich izolovaná DNA byla ověřena pomocí Sangerovy metody sekvenace.

Mutantní formy studovaných proteinů byly připraveny dle protokolu od společnosti Stratagene (QuickChange™ site-directed mutagenesis kit, Stratagen, USA). Postup zahrnuje čtyři fáze (viz obr. 4.1, str. 46) :

1. navržení komplementárních oligonukletidů nesoucích danou mutaci
2. polymerázová řetězová reakce v prostředí Pfu Ultra polymerasy, která vede k tvorbě nové mutantní plasmidové DNA, avšak přerušené v místě konců primerů.
3. inkubace s enzymem DpnI, který specificky rozpoznává a štěpí pouze templátovou metylovanou DNA
4. vnesení mutantního plasmidu do bakterií pomocí transformace, kde dochází k jeho uzavření a namnožení

Jedinou proměnnou v programu PCR byla teplota nasedání primerů, která v případě mutací ASK1 a TRX1 byla 51 °C.



Obr. 4.1 Schéma postupu pro cílenou mutagenezi. Převzato a upraveno dle <<https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/200523.pdf>>.

Expresní konstrukty lidské thioredoxin vazebné domény ASK1 kinasy (ASK1-TBD), tryptofanové mutanty a mutant C250S byly připraveny Dr. Lenkou Řežábkovou a Dr. Veronikou Obšilovou. Expresní konstrukt lidské CaMKK2 a její mutantní formy, včetně inaktivního mutantu, byly připraveny Mgr. Olívií Petrvalskou, Dr. Veronikou Obšilovou a Mgr. Danou Kalábovou. Případný dopad mutagenese na změnu struktury proteinů byl ověřen měřením jejich teplotní stability pomocí diferenční skenovací fluorimetrie (viz kap. 4.3.6, str. 66).

Izolovaná DNA byla do expresního kmenu bakterií vnesena pomocí transformace a buňky byly naneseny na agarové misky. Kultura z agarových misek byla inokulována do 5 ml LB-média a inkubována na třepačce při 37 °C a 200 ot/min přes noc. Z miniprepu byly dále připraveny glycerolové zásobní roztoky, které lze zmrazit při -80°C a opakovaně využít k inokulaci média. Tyto roztoky byly připraveny smísením 800 µl miniprepu a 300 µl sterilního glycerolu.

Pro velkoobjemovou expresi proteinů byl ve všech případech použit expresní kmen bakterií *E. coli* BL21(DE3). Při inducibilní expresi byla vždy používána fixní koncentrace IPTG (0,5 mM). Exprimované proteiny byly dále purifikovány v několika krocích. V první fázi byly bakteriální kultury centrifugovány na centrifuze Sigma 8K (Sigma Laborzentrifugen, Německo – max. 6×1800g) při 3200 ot/min, 4 °C a po dobu 20 minut. Pelety buněk byly resuspendovány v lyzačním pufru se složením 1× PBS, 1M NaCl, 4mM β-ME a 2mM imidazol (150 ml na 3l buněčné suspenze). Pro efektivní lyzi buněk byla směs inkubována s lysozymem o konečné koncentraci 100 µg.ml⁻¹ po dobu

15-30 minut. Před sonikací ultrazvukem byl ke směsi přidán 0,1M roztok PMSF (inhibitor serinových proteas) do konečné koncentrace 1 mM. Celkový čas sonikace byl stanoven podle objemu bakteriální suspenze, nejčastěji na 10-15 minut. Po krátkých tří-sekundových impulzech následovala pauza sedmnáct sekund, aby nedocházelo k přílišnému zahřívání směsi. Sonikát byl centrifugován po dobu 40 min při 13500 ot/min) a 4°C (centrifuga Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH, Německo – max. 15000 ot/min). Pro další purifikační krok byl použit pouze supernatant obsahující směs všech rozpustných proteinů.

Složení 10 × PBS pufru (pH upraveno na 7,4): 1,37M NaCl; 27mM KCl; 100mM Na₂HPO₄; 18mM KH₂PO₄

Ve všech případech kromě purifikace kalmodulinu (CaM) byla k izolaci rekombinantního proteinu použita niklová chelatační chromatografie. Chelatační matrice s vázanými ionty niklu specificky interaguje s postranními zbytky histidinové kotvy (motiv šesti histidinů v řadě), hojně využívané fúzní značky v oblasti molekulární biologie. Malá velikost, hydrofilní charakter a flexibilita této sekvence pozitivně ovlivňuje stabilitu a rozpustnost proteinu. Možný dopad této fúzní sekvence na funkci proteinu byl zaznamenán jen ojediněle a z toho důvodu je možné ji pro některé studie v sekvenci proteinu zanechat.

Na kolonu bylo nanášeno 3ml sepharosy „Chelating Sepharose Fast Flow“ (GE Healthcare, USA), která byla nabita 0,1M roztokem síranu nikelnatého. Množství sepharosy se liší v závislosti na očekávaném výtežku, přičemž vazebná kapacita se pohybuje kolem 5 mg.ml⁻¹ nosiče. Na kolonu bylo dále aplikováno malé množství nanášecího pufru a sonikát. Ke zvýšení účinnosti vazby proteinu byla v některých případech směs sonikátu a sepharosy inkubována na ledu po dobu 30 min. Kvůli odstranění nespecifických interakcí byla kolona promyta 350 ml promývacího pufru. Z důvodu precipitace proteinů v přítomnosti imidazolu byl protein při eluci ihned ředěn do dialyzačního pufru v poměru 1:2. Protein byl vymýván puftrem s obsahem 600mM imidazolu.

Složení nanášecího pufru: 1× PBS; 0,5M NaCl; 2mM β-ME; 1mM imidazol

Složení elučňího pufru: 1× PBS; 0,5M NaCl; 2mM β-ME; 0,6M imidazol (pH 8,0)

Promývací pufr byl připraven ředěním elučňího pufru nanášecím pufrem v poměru 1:9. Složení 10 x PBS pufru viz str. 47.

Čistota a integrita proteinu byla kontrolována pomocí elektroforetické separace v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) - SDS-PAGE. Koncentrace polyakrylamidu v používaných gelech byla 12% (w/w) nebo 15% (w/w). Složení roztoků a gelů potřebných k SDS-PAGE je uvedeno v tab. 4.1-4.6 (str. 48-50). Vzorky byly míseny se vzorkovacím pufrem v poměru 4:1. Elektroforéza probíhala při napětí 200 V po dobu 45 min. Proteiny byly vizualizovány zahřátím gelu v barvicím roztoku. Postup přípravy barvicího roztoku byl následující: 60-80 mg Coomassie Brilliant Blue R250 bylo rozpouštěno v 1l vody po dobu 3 hod a poté byla do roztoku přidána HCl do konečné koncentrace 35 mM. Následné odbarvení bylo provedeno zahřátím gelu v destilované vodě.

Tab. 4.1 *Složení 4×pufru pro separační gel*

látká	odměřený objem
2M Tris-HCl, pH 8,8	75 ml
10% SDS (w/v)	4 ml
destilovaná voda	do 100 ml

Tab. 4.2 *Složení 4× pufru pro zaváděcí gel*

látká	odměřený objem
1M Tris-HCl, pH 6,8	50 ml
10% SDS (w/v)	4 ml
destilovaná voda	do 100 ml

Tab. 4.3 Složení 10× pufru pro elektroforézu (před použitím nutno 10× naředit)

látk	odměřené množství
Tris-base	30 g
glycin	144 g
SDS	10 g
destilovaná voda	do 1 l

Tab. 4.4 Složení 5× pufru pro přípravu vzorku (vzorkovací pufr)

látk	odměřený objem
1M Tris-HCl, pH 6,8	0,6 ml
50% glycerol (w/v)	5 ml
10% SDS	2 ml
β-merkapt ethanol	0,5 ml
1% bromfenolová modř	1 ml
destilovaná voda	do 10 ml

Tab. 4.5 Složení separačního gelu pro SDS-PAGE

	12% gel	15% gel
látk	odměřený objem	odměřený objem
akrylamid/bis-akrylamid	3 ml	3,75 ml
4× pufr pro separační gel (+10% SDS)	2 ml	2 ml
destilovaná voda	2,6 ml	1,85 ml
10% (w/v) persulfát amonný (APS)	45 µl	45 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Tab. 4.6 Složení zaváděcího gelu pro SDS-PAGE

látka	odměřený objem
akrylamid/bis-akrylamid	0,5 ml
4 × pufr pro zaváděcí gel (+ 10% SDS)	1 ml
destilovaná voda	2,25 ml
10% (w/v) persulfát amonný (APS)	45 µl
TEMED	5 µl

V další fázi následovalo odštěpení fúzního partnera prostřednictvím TEV proteasy. Štěpení probíhalo při 30 °C po dobu 1-2 hod, případně ještě přes noc při 4 °C. Na 1 mg proteinu bylo použito 250 U TEV proteasy. Kompletní odštěpení fúzní kotvy bylo ověřeno pomocí SDS-PAGE.

Proteiny byly před provedením dalších typů FPLC chromatografie koncentrovány pomocí centrikonů Amicon Ultra (EMD Millipore, USA) na centrifuze Eppendorf 5804 R při 2500 ot/min a teplotě 4 °C.

Iontově výměnná chromatografie je dalším vhodným purifikačním postupem, pokud se pI studovaného proteinu nachází v kyselé nebo bazické oblasti. Protein nacházející se v prostředí s pH alespoň o dvě jednotky vyšší než je jeho pI obsahuje vysoké procento záporně nabitých skupin. Z toho důvodu může dojít k jeho účinné separaci na koloně obsahující iontoměnič Q-sefarózu (GE Healthcare, USA) nesoucí kvarterní amoniové ionty. V rámci této práce byla aniontová výměna použita při purifikaci proteinu 14-3-3γ, jehož pI je 4,85.

Gelová permeační chromatografie separuje proteiny na základě jejich hydrodynamického poloměru a velikosti. Je tedy nezbytnou součástí purifikace, protože jedině tak lze účinně odstranit proteinové agregáty. Pevnou fází chromatografické kolony je dextran vázaný na zesíťovanou agarosu o různé velikosti pórů, známý pod komerčním názvem Superdex. Výběr typu matrice se odvíjí od velikosti studovaného proteinu. Číslo uvedené za názvem Superdex udává maximální relativní molekulovou hmotnost částic v řádech 1000, která je na koloně ještě zadržována. Dalším voleným parametrem může být i objem kolony, přičemž větší

objem zajišťuje lepší separační schopnost. Na takové kolony lze také nanášet větší množství vzorku, a proto se používají i při purifikaci proteinů s vysokým výtěžkem.

Iontově výměnná a gelová permeační chromatografie byly provedeny na přístroji FPLC-ÄKTA (Amersham Biosciences, Švédsko). Čistota a integrita proteinu v jednotlivých frakcích byla ověřena provedením SDS-PAGE.

Frakce obsahující protein s uspokojivou čistotou byly sloučeny a proteinová koncentrace byla stanovena spektrofotometricky při 280 nm. Teoretická hodnota molárního absorpčního koeficientu byla vypočítána na základě primární struktury pomocí volně dostupné webové aplikace Protparam. Dostupné z <<http://web.expasy.org/protparam/>>.

4.2.1 Exprese a purifikace ASK1-TBD

Pro experimenty byly na základě predikce sekundární struktury navrženy různé kratší verze N-terminální domény ASK1, ale optimální výtěžky a čistotu přinesla pouze exprese a purifikace konstruktu ASK1 88-302. Gen lidské formy ASK1-TBD (sekvence 88-302 zahrnující část TRX1 vazebné domény) byl zaklonován do expresního plasmidu pST39 mezi XbaI a BamHI místa, jehož exprese v buňkách byl získán fúzní protein s C-terminální histidinovou kotvou. Transformovaná kultura byla přenesena do 5 ml LB média a inkubována přes noc při 200 ot/min a 37 °C. Každý miniprep byl přenesen do 1l TB média a exprese probíhala při 25 °C a 190 ot/min po dobu 24 hod. Protein byl izolován pomocí sonikace a niklové chelatační chromatografie. Vzhledem k tomu, že protein nesl vysoké koncentrace imidazolu, byl okamžitě ředěn do pufru na gelovou filtraci (20mM Tris (pH 7,5), 1mM EDTA, 0,5M NaCl, 10% (w/v) glycerol, 5mM DTT). Gelová permeační chromatografie byla provedena na koloně Hiload 26/60 Sup 75 (GE Healthcare, USA). Následně byl protein dialyzován do pufru stejného složení, s výjimkou nižší koncentrace NaCl (0,2M).

4.2.2 Exprese a purifikace TRX1

DNA konstrukt mutantní verze lidského thioredoxinu TRX1 C73S s N-terminální histidinovou kotvou v plasmidu pQE-30 byl získán darem od Dr. Katji Becker (Justus-Liebig-Universität, Giessen, Německo). Mutace cysteinu 73 na serin byla provedena s cílem potlačit kovalentní dimerizaci TRX1 při vysokých koncentracích. Je známo, že tato mutace nemá dopad na katalytickou aktivitu TRX1. TRX1 s N-koncovou histidinovou kotvou byl rovněž exprimován v buňkách *E. coli* kmen BL21(DE3) prostřednictvím IPTG indukce při 30 °C a 190 ot/min po dobu 17 hod. Izolace proteinu probíhala standardním způsobem pomocí sonikace a niklové chelatační chromatografie. Protein byl převeden do pufru 20mM Tris (pH 7,5), 1mM EDTA, 200mM NaCl, 10% (w/v) glycerol, 5mM DTT provedením gelové permační chromatografie na koloně Sup 75 10/300 GL (GE Healthcare, USA).

4.2.3 Exprese a purifikace CaMKK2

DNA oblast kódující lidskou CaMKK2 (93-517) byla zaklonována do plasmidu pRSFDuet-1 (Novagen) mezi BamHI a NotI místa. Upravený plasmid s N-koncovým GB_1 proteinem značeným histidinovou kotvou a štěpným místem pro TEV proteasu byl získán darem od Dr. Evžena Bouři (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry AS CR, Prague, Czech Republic).

Vzhledem k četné proteinové degradaci mutantní varianty CaMKK2 byl původní purifikační protokol optimalizován. Nejlepší výsledky poskytla exprese v autoindukčních médiích ZY. Celková doba kultivace nepřesahovala dobu 17 hod, pro zajištění kvality a integrity proteinu. Teplota byla snížena po 4 hod inkubace při 37 °C na 20 °C. Protein byl dále izolován pomocí sonikace a niklové chelatační chromatografie. Eluát byl ředěn dialyzačním pufrem (50mM Tris (pH 8,0), 0,5 M NaCl, 4mM β -ME, 4mM EDTA and 10% (w/v) glycerol) v poměru 1:2. Protein byl přes noc dialyzován a následně štěpen pomocí TEV proteasy po dobu 1 hod při 30 °C. Protein byl dále purifikován prostřednictvím gelové permeační chromatografie na koloně Hiload 26/60 Sup 75 (GE Healthcare, USA). Následovala jeho fosforylace pomocí PKA (Promega, USA) po dobu 2 hod při 30 °C a poté přes noc při 4°C (167 U PKA /mg proteinu/1 fosforylační místo) v prostředí 0,75mM ATP a 20mM MgCl₂. Finální

purifikace byla provedena na koloně Sup 75 Increase 10/300 (GE Healthcare, USA) v pufru obsahujícím 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 1mM TCEP, 1mM CaCl₂ a 10% (w/v) glycerol. Fosforylační status byl ověřen pomocí MS/MS analýzy.

4.2.4 Exprese a purifikace CaM

Některé Ca²⁺ vázající proteiny jsou izolovány prostřednictvím hydrofóbní interakční chromatografie. V přítomnosti vápníku tyto proteiny exponují svůj hydrofóbní povrch a jsou adsorbovány na fenylsepharosovou matici. Na rozdíl od jiných hydrofóbních proteinů vykazují tuto schopnost i v přítomnosti nízké koncentrace soli, což ve výsledku znamená, že je protein izolován ve velmi čisté formě (Vogel *et al.*, 1983). Eluce je provedena v nepřítomnosti vápníku, což vyvolá odlišnou proteinovou konformaci a tak dochází k jeho uvolnění z matrice.

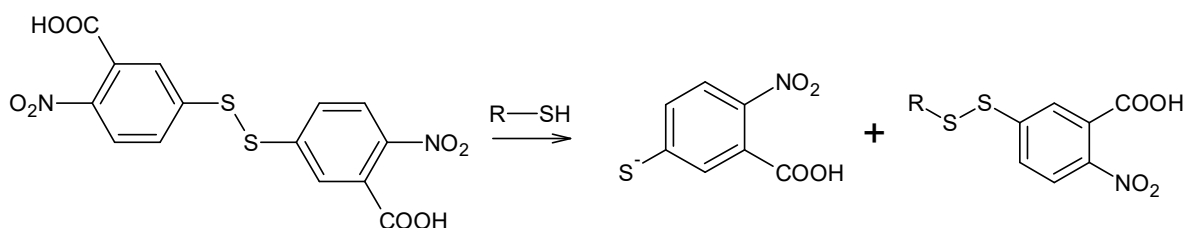
DNA potkaní formy kalmodulinu (1-149) byl klonována do plasmidu pET-3a mezi místa NdeI a BamHI. Protein byl exprimován pomocí IPTG indukce při 25 °C po dobu 12 hod. Pelety buněk byly resuspendovány v lyzačním pufru obsahujícím 50 mM Tris (pH 7,5), 2mM EDTA, 2mM β-ME. Protein byl izolován nejprve pomocí sonikace a následně proběhla jeho purifikace na Phenyl Sepharose CL4B (Amersham Biosciences) v přítomnosti 5mM CaCl₂. Kolona byla postupně promývána soustavou několika pufrů (viz níže). Před aplikací sonikátu byl nanesen pufr A. Po adsorpci proteinu následovalo promytí kolony pufrů B a C v uvedeném množství. Eluce proteinu byla provedena pufr D bez obsahu vápníkových iontů. Protein byl koncentrován a purifikován pomocí FPLC systému na koloně Sup 75 Increase 10/300 (GE Healthcare, USA) v pufru se složením 20mM Tris (pH 7,5), 100mM NaCl, 1mM CaCl₂, 10% glycerol, 5mM DTT.

Pufr A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100mM NaCl; 5 mM CaCl ₂	(60 ml)
Pufr B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl ₂	(40 ml)
Pufr C: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 1 mM CaCl ₂	(60 ml)
Pufr D: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1,5 mM EDTA	(20 ml)

4.3 Biofyzikální a strukturní charakterizace

4.3.1 Stanovení volných thiolových skupin a oxidace proteinů

Spektrofotometrické stanovení volných thiolových skupin na základě jejich reakce s DTNB (kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová) bylo využito k detekci tvorby disulfidických můstků (Cys³²-Cys³⁵, Cys⁶²-Cys⁶⁹ nebo oba) na různých místech TRX1 při jeho oxidaci. Při této reakci v denaturujících podmínkách vzniká nitrothiobenzoátový anion (TNB²⁻, viz obr. 4.2) a disulfidicky spojený konjugát proteinu s TNB. Koncentraci volného nitrothiobenzoátového anionu lze stanovit měřením absorbance při vlnové délce 412 nm. Podíl koncentrace TNB²⁻ a proteinové koncentrace ve vzorku pak představuje počet volných sulfhydrylových skupin proteinového řetězce (Ellman, 1958).



Obr. 4.2 Schéma reakce kyseliny 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové s volnou sulfhydrylovou skupinou. Při reakci vzniká nitrothiobenziátový anion, který lze detekovat spektrofotometricky.

Proteiny o dané koncentraci (15-20 μM) byly inkubovány ve tmě v prostředí 6M guanidin-hydrochloridu (Gu-HCl) a 1mM DTNB ve finálním objemu 350 μl po dobu 15 min. Zásobní roztoky Gu-HCl a DTNB byly připraveny v pufru 200mM Tris (pH 8,0). Pro výpočet počtu volných thiolových skupin byl použit molární absorpční koeficient TNB²⁻ 13600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Oxidované formy proteinů ASK1-TBD a TRX1, TRX1 WT byly připraveny následovně: Proteiny byly nejprve dialyzovány do pufru s 20mM Tris (pH 7,5), 200mM NaCl a 5mM DTT. Redukovaný stav proteinů byl určen pomocí spektrofotometrického stanovení volných cysteinů v přítomnosti Ellmanova činidla. Následně byly proteiny převedeny do stejného pufru bez DTT pomocí kolony Zeba[™]

Spin Desalting Column (Thermo Scientific). Oxidace byla provedena v přítomnosti 5násobného nebo 100násobného molárního nadbytku H_2O_2 při 37 °C po dobu 15 min. Reakce byla ukončena přidáním 5U katalasy (Sigma Aldrich, USA).

4.3.2 SDS-PAGE za neredukujících podmínek

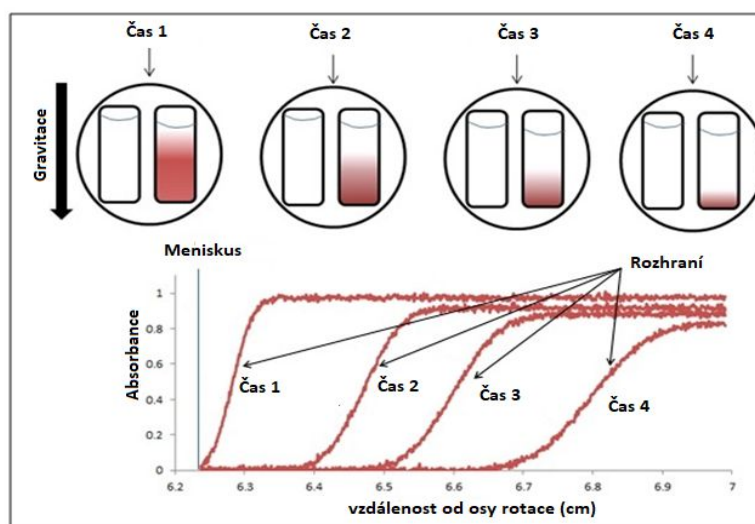
SDS-PAGE za neredukujících podmínek funguje na stejném principu jako klasická SDS-PAGE (složení gelů i pufrů totožné, bez β -ME viz str. 48-50) s tím rozdílem, že vzorky nejsou zahřívány a vzorkovací pufr neobsahuje redukční činidla. ASK1-TBD, TRX1 a komplex v poměru 1:1 byly dialyzovány do pufru obsahujícího 20mM Tris (pH 7,5) a 200mM NaCl. Vzorky byly odebrány po 12h a 36h dialýzy při 4 °C a smíseny se vzorkovacím pufrem v poměru 4:1. Elektroforéza probíhala při napětí 150 V přibližně 80 min. Pomocí tohoto experimentu byla studována interakce ASK1-TBD s TRX1 za neredukujících podmínek z hlediska tvorby intermolekulárních disulfidických můstků při oxidaci.

Analogicky se postupovalo i při studiu interakce ASK1-TBD s TRX1 C35,73S za oxidujících podmínek. Při studiu oxidace ASK1-TBD nemohl být použit TRX1 z důvodu, že vlastní redoxní aktivitu, což by vedlo ke zpětné redukci ASK1-TBD. Daná mutantní varianta byla vybrána na základě srovnatelné vazebné afinity k ASK1-TBD. Nejprve byly proteiny odsoleny pomocí kolony Zeba™ Spin Desalting Column (Thermo Scientific) a část ASK1-TBD byla oxidována za mírných podmínek (5násobný molární nadbytek H_2O_2 , viz kap. 4.3.1, str. 54). Neoxidované vzorky byly inkubovány při 4 °C po dobu 24h.

4.3.3 Analytická ultracentrifugace – metoda sedimentačních rychlostí

Cílem sedimentační analýzy je charakterizace studovaných molekul z hlediska molekulární hmotnosti, sedimentačního koeficientu a hydrodynamických vlastností. Ze sedimentačních dat lze získat odhad velikosti částic bez nutnosti kalibrace, jejich tvaru a informace ohledně polydisperzity. Zdokonalení moderní instrumentace, které zjednodušilo akvizici dat i jejich vyhodnocování, z této metody činí mocný nástroj

pro studium biologických dějů (Schachman, 1989). Rostoucí popularita této techniky souvisí především s jejím využitím pro studium rovnovážných systémů a protein-proteinových interakcí včetně stanovení důležitého biofyzikálního parametru vazebné afinity - zdánlivé disociační konstanty K_D (Schuck, 2013). Přestože existuje mnoho alternativních metod, kterými lze stanovit tyto termodynamické vlastnosti, mnohé z nich vyžadují kalibrace, sekundární značení proteinu nebo nejsou vhodné pro studium nízkoafinitních komplexů. Další nespornou výhodou této metody je studium makromolekul v nativním stavu za biologicky relevantních podmínek (Cole *et al.*, 2008).



Obr. 4.3 *Metoda sedimentačních rychlostí.* Vlivem centrifugace dochází k sedimentaci jednotlivých komponent a vytvoření tzv. sedimentačního (koncentračního) rozhraní, jehož pohyb je sledován v čase. Převzato a upraveno z <[http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-\(sv-auc\)/>](http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-(sv-auc)/>).

Vlivem gravitačního pole, které je v tomto případě generováno centrifugací při vysokých otáčkách, dochází k sedimentaci částic v roztoku. Rychlost sedimentace je dána rovnováhou tří sil, které na částici působí:

1) Centrifugační síla – úměrná hmotnosti částice, úhlové rychlosti a vzdálenosti od osy rotace:

$$F_{centr} = m_a \omega^2 r,$$

kde m_a je hmotnost částice, ω je úhlová rychlost a r představuje vzdálenost od osy rotace. Je zřejmé, že dochází k postupné akceleraci molekul v roztoku a pozorujeme

tak exponenciální závislost radiální pozice na čase. Analytická centrifuga dokáže generovat gravitační sílu až 300 000g (Schuck, 2016).

2) Vztlková síla – závisí na parciálním specifickém objemu částice a hustotě používaného rozpouštědla:

$$F_b = -m_a \bar{v} \rho \omega^2 r,$$

kde člen $m_a \bar{v} \rho$, představuje hmotnost rozpouštědla vytlačené částicí (\bar{v} je parciální specifický objem částice a ρ je hustota rozpouštědla)

3) Frikční síla – působí proti směru pohybu částice a závisí na hydrodynamických vlastnostech makromolekuly (hydrodynamickém poloměru částice) a viskozitě rozpouštědla:

$$F_f = -f v,$$

kde f představuje hydrodynamický translační frikční koeficient a v rychlost jakou se částice pohybuje (Schuck, 2016).

Sedimentační koeficient s je vyjádřen v jednotkách Svedberg $\sim 10^{-13}$ sec. Z výše uvedeného vyplývá, že jeho hodnota závisí na velikosti studované makromolekuly i jejím tvaru následovně:

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{m_a(1 - \bar{v} \rho)}{f}, \quad (\text{Rovnice 1})$$

Sedimentační koeficient může nabývat kladných i záporných hodnot v závislosti na relativní hustotě částice a rozpouštědla a z toho plynoucí sedimentace částice nebo její nadnášení.

Data měřená pomocí AUC reprezentují koncentrační profily v radiálním směru (ve směru působení odstředivé síly) jako funkci času (Lebowitz *et al.*, 2009). Z toho vyplývá, že v případě jediné neinteragující částice (tedy jediné sedimentačního rozhraní) by určení sedimentačního koeficientu bylo vcelku snadné, např. z exponenciální závislosti radiální pozice inflexního bodu rozhraní na čase. (Schuck, 2016). V reálné situaci je však přítomno více sedimentujících komponent, které vykazují různá rozhraní v důsledku odlišných hydrodynamických vlastností. Dnešní výpočetní technika umožňuje získaná data modelovat přímo prostřednictvím

fundamentální rovnice sedimentační rychlosti, která nese název podle svého průkopníka - Lammova rovnice (Lamm, 1929):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(cs\omega^2 r - D \frac{\partial c}{\partial r} r \right) \quad (\text{Rovnice 2})$$

Lammova rovnice popisuje vývoj koncentrační distribuce ∂c na čase t a vzdálenosti od osy rotace r pod vlivem protichůdného difúzního a sedimentačního toku (D je difúzní koeficient).

Při měření sedimentační rychlosti se používají sektorové cely kónického tvaru, které omezují proudění v průběhu experimentu. Cely obsahují dva sektory, z nichž v jednom je umístěný vzorek a ve druhém referenční pufr (Cole *et al.*, 2008).

Existují dva nejdůležitější druhy optických systémů, jimiž je možno sedimentační data monitorovat – absorpční a interferenční. Absorpční optika umožňuje měřit v rozmezí vlnových délek 190-800 nm a je tedy vhodná pro studium proteinů. V tomto ohledu je však nutná opatrnost ohledně složení pufru, jelikož i mnoho dalších biologických složek pufru může absorbovat v dané oblasti (disulfidy, některé detergenty) (Laue, 1996). V případě příliš vysokého nebo nízkého extinkčního koeficientu není absorpční optika dobrou volbou. Naproti tomu interferenční optika poskytuje několik výhod. Signál je zaznamenáván v podobě horizontálních hran (z angl. „fringes“) rovnoměrně rozmístěných ve vzdálenosti odpovídající rozdílu optické dráhy prošlého paprsku mezi referencí a vzorkem. Tento dráhový rozdíl odráží jakékoliv změny v indexu lomu světla ve vzorku závislejícím na molekulové hmotnosti sedimentujících komponent. Pomocí refraktometrické detekce lze tedy studovat i neabsorbující molekuly jako jsou polysacharidy nebo lipidy. Na rozdíl od absorbance jsou interferenční data snímána po celé délce kyvety naráz a akvizice dat je mnohem rychlejší. To umožňuje sbírat mnohem větší objem dat a získat tak přesnější odhad hledaných parametrů. Vzhledem k citlivosti detekce jsou však ve výsledku zahrnuty veškeré optické nedokonalosti a nečistoty, které jsou souhrnně nazývány časově-neměnným systematickým šumem. V důsledku teplotní nebo mechanické nestability detekčního systému jsou data zatížena i radiálně-neměnným systematickým šumem. Oba typy šumů, které neumožňují přímou interpretaci interferenčních dat, musí být před vlastní analýzou eliminovány (Schuck & Demeler, 1999; Cole *et al.*, 2008).

Analýzou sedimentačních profilů užitím softwaru SEDFIT lze získat kontinuální distribuci sedimentačních koeficientů. Pro zjištění vazebné afinity je nezbytné provést měření v různém molárním poměru studovaných proteinů. Integrací distribuce $c(s)$ za různých podmínek je získán celkový vážený průměrný sedimentační koeficient $s_w(c)$. Na základě znalosti koncentrace a hodnot celkových sedimentačních koeficientů lze konstruovat vazebnou izotermu, která je fitována s použitím vhodného vazebného modelu (v tomto případě Langmuirův model $A + B \rightleftharpoons AB$) zahrnutém v programu SEDPHAT. Výsledné parametry a reálné koncentrace ve vzorcích byly zkorigovány prostřednictvím globálního modelování pomocí Lammovy rovnice.

Pro sedimentační analýzu byla použita analytická ultracentrifuga ProteomLab™ XL-1 (Beckman Coulter, USA). Hustota pufru, viskozita a specifický parciální objem pro všechny proteiny byly stanoveny prostřednictvím programu SEDNTERP (<http://sednterp.unh.edu/>). Měření byla prováděna při 48 000 ot.min⁻¹ a 20 °C (An-50 Ti rotor, Beckman Coulter, USA) při různém molárním poměru a koncentraci proteinů (specifikováno v kap. 5 Výsledky). Sedimentační profily byly zaznamenávány absorpční i interferenční optikou. Měření a vyhodnocování dat byla realizována ve spolupráci s Dr. Daliborem Koškem a Mgr. Olívií Petřalskou.

1) ASK1-TBD a TRX1

Vzorky proteinů při oxidujících podmínkách byly předem dialyzovány do pufru 20mM Tris (pH 7,5), 200mM NaCl. V případě redukujících podmínek pufr navíc obsahoval 2mM nebo 5mM β -merkaptoethanol.

2) CaMKK2 a 14-3-3 γ

Měření byla provedena v pufru obsahujícím 50mM Tris (pH 7,5), 150mM NaCl, 1mM TCEP a 1mM CaCl₂ za stejných podmínek a data byla vyhodnocena pomocí globálního modelování Lammovy rovnice s použitím 1:1 Langmuirova vazebného modelu.

4.3.4 Limitovaná defosforylace s použitím SDS-Phos-tag-PAGE

Pomocí elektroforetické separace v SDS-polyakrylamidovém gelu, který má v sobě zakomponovanou aromatickou molekulu Phos-tag (Wako, USA) lze jednoduše sledovat kinetiku defosforylace v přítomnosti fosfatas. Tato látka je schopná imobilizovat dvojmocné kationty (Mn^{2+} nebo Zn^{2+}) a vázát fosfátové skupiny, čímž lze vzájemně separovat různé fosforylační stavy proteinu.

pCaMKK2 D330A byla defosforylována v přítomnosti nebo nepřítomnosti 14-3-3 γ s použitím proteinfofatas 1 (PP1 – králíčí katalytická podjednotka α -Isoforma, Sigma-Aldrich, USA, specifická aktivita 5000U/mg). Defosforylace byla provedena v prostředí pufru pro fosfatasu obsahujícího 50mM HEPES (pH 7,5), 100mM NaCl, 2mM DTT, 1mM $MnCl_2$ a 0,01% NP-40. Reakční směs obsahovala 11 μ M CaMKK2 a 34 μ M 14-3-3 γ (v případě komplexu) a PP1 v optimálním molárním poměru 1/250 (enzym/substrát). Reakce probíhala při 30 °C a v časových intervalech 0, 1,5, 7 a 30 min byly odebírány alikvoty (64 pmol).

Tab. 4.7 Složení separačního gelu pro SDS-Phos-tag-PAGE

12% gel	
látka	odměřený objem
akrylamid/bis-akrylamid	4 ml
4× pufr pro separační gel (+10% SDS)	2,5 ml
5mM Phos-tag	100 μ l
10mM $MnCl_2$	100 μ l
destilovaná voda	3,24 ml
TEMED	10 μ l
10% (w/v) persulfát amonný (APS)	50 μ l

Reakce v daném čase byla zastavena přidávkem β -glycerolfosfátu do finální koncentrace 100mM (Sigma-Aldrich, USA), dále smísením s 5x SDS redukujícím vzorkovacím puforem (viz tab. 4.4, str. 49) a zahřátím vzorků na 95 °C po dobu 5 min. Separace směsi byla provedena na SDS-Phos-tag-PAGE s procentuálním zastoupením

akrylamidu 12% a 50 μ M Phos-tagem (viz tab. 4.7, str. 60). Složení zaváděcí gelu bylo totožné jako při klasické SDS-PAGE (viz tab. 4.6, str. 50). Elektroforéza probíhala 2 hod při 180V. Vzorky byly v daných časech rovněž podrobeny LC-MS/MS analýze na základě stejného experimentálního přístupu jako v případě H/D výměny (viz kap. 4.3.5.1).

4.3.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) již dlouhou dobu neslouží pouze jako nástroj organickým chemikům k detekci malých molekul. S rostoucím vývojem instrumentace v posledních dvou dekadách a objevu měkkých ionizačních technik (ESI a MALDI) patří tato metoda mezi skvělé komplementární techniky k NMR nebo krystalografii. V oblasti proteomiky zastává nezastupitelnou úlohu při stanovení postranlačních modifikací a kvantifikaci proteinů, čímž napomáhá k objasnění signálních drah a studiu nových biomarkerů při patogenezi. Díky spojení MS s dalšími přístupy lze dobře studovat dynamiku molekul či mapovat interakční rozhraní, které nám statické metody jako např. krystalografie neumožňují. Metody H/D výměny, chemického zesíťení nebo alkylace cysteinových skupin pro mapování povrchu mohou být užitečné při návrhu finálního interakčního modelu a výrazně pomoci k objasnění molekulárního mechanismu regulace. V této práci zastavají metody spojené s MS důležitou úlohu a získané výsledky byly klíčové např. při studiu oxidace ASK1, kde ostatní přístupy selhaly (Karas & Hillenkamp, 1988; Schmidt & Robinson, 2014).

4.3.5.1 H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií

Proteinový řetězec obsahuje několik typů vodíkových atomů, které jsou neustále vyměňovány s vodíky okolního vodného prostředí: amidické vodíky peptidové vazby, vodíky postranních řetězců a vodíky vázané na uhlíkové atomy polypeptidového řetězce. V časové škále měření lze zaznamenat pouze výměnu amidických vodíků. Pokud se protein navíc nachází v prostředí s deuterovanou vodou, lze tento přístup spojit s hmotnostně spektrometrickou analýzou a sledovat tak poměr deuterace v různých oblastech proteinu. Mezi hlavní faktory, které ovlivňují tento proces, patří především teplota, pH, přístupnost rozpouštědla a síť vodíkových vazeb (Englander & Kallenbach, 1983). Vliv prvních dvou jmenovaných jde jednoduše kontrolovat, ale

přístupnost a vodíkové vazby přímo vypovídají o dané proteinové konformaci. Na základě rozdílu v deuteracním profilu lze díky této technice sledovat konformační změny při vazbě ligandu a přímo mapovat oblasti, které jsou touto vazbou ovlivněny. H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií slouží ke studiu interakčního rozhraní dvou proteinů nebo proteinu s navázaným ligandem (Wales & Engen, 2006). V rámci této práce byla uplatněna pro studium vazby kalmodulinu na CaMKK2, která má odlišný charakter ve srovnání s ostatními Ca^{2+} /kalmodulin dependentními kinasami. Vzhledem k vysoké afinitě a stabilitě tohoto komplexu bylo důvodné očekávat výrazné změny v deuteraci jednotlivých oblastí CaMKK2.

Vodík/deuteriová výměna byla sledována za dvou různých podmínek – CaMKK2 a CaMKK2 v komplexu s CaM v poměru 1:1. Reakce byla zahájena 10násobným ředěním do deuteracního pufru obsahujícího 50 mM Tris-HCl (pH/pD 7,5), 150mM NaCl, 1mM TCEP and 1mM CaCl_2 do konečné proteinové koncentrace 3 μM . Alikvoty o objemu 25 μl byly odebírány v časových intervalech 20 s, 1min, 3 min, 10 min, 1 h, 3 h a 5 h. Reakce byla zastavena ředěním do 25 μl 1M glycinu (pH 2,3) a zmražením v kapalném dusíku. Analýza deuterovaných vzorků byla provedena pomocí HPLC (1200 Agilent technologies, Waldbronn, Německo) spojené s ESI-FT-ICR hmotnostním spektrometrem (15T solariX, Bruker Daltonics, Billerica, USA). Před HPLC-MS analýzou byly vzorky brzkně rozmrazeny a nanесeny na systémovou pepsinovou kolonu, kde proběhlo jejich štěpení v intervalu 3 min (objem 66 μl , průtoková rychlost 100 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$). Vzniklé peptidy byly v systému odsoleny na koloně Peptide Microtrap (Optimize Technologies, Oregon, USA) a separovány na koloně s reverzní fází (ZORBAX 300SB-C18 3,5 μm , 0,5 x 35 mm, Agilent technologies, Santa Clara, USA). Pro separaci byl použit lineární gradient 10-45% rozpouštědla B v průběhu 20 min. Rozpouštědlo A obsahovalo acetonitril a kyselinu mravenčí ve vodě v poměru 2%/0,4%. Rozpouštědlo B obsahovalo směs acetonitrilu, vody a kyseliny mravenčí v poměru 95%/5%/0,4%. Kyselina mravenčí zastává funkci ion-párového činidla pro zvýšení efektivity separace. Pro minimalizaci zpětné H/D výměny byl nástřikový a přepínací ventil a soustava všech tří kolon ponořena v ledové lázni. Identifikace jednotlivých peptidů (mapování a HPLC-MS/MS) byla provedena výše popsaným způsobem. MS/MS spektra byla vložena do volně dostupného programu MASCOT, kde byla porovnána s databázemi obsahující aminokyselinové

sekvence CaMKK2 a CaM. Spektra částečně deuterovaných peptidů byla exportována pomocí programu Data Analysis 4.2 a manuálně zpracována v programu DeutEX. Analýza a měření vzorků byla provedena ve spolupráci s Dr. Petrem Pompachem, (Biotechnologický ústav AV ČR, BIOCEV, Vestec).

4.3.5.2 Chemické zesíťení spojené s hmotnostní spektrometrií

Chemické zesíťení je dalším z přístupů pro studium trojrozměrné struktury proteinů a jejich konformačních změn. Různé funkční skupiny aminokyselin mohou být kovalentně spojovány pomocí homobifunkčních činidel s různou délkou raménka. Diference v souboru vzniklých zesíťovaných peptidů u proteinu a komplexu mohou poukázat na jisté konformační změny. Zároveň však tato metoda slouží především k upřesnění strukturních modelů získaných z jiných metod např. krystalografie nebo SAXS (Sinz, 2006).

Využití stabilního izotopového značení těchto činidel značně usnadňuje identifikaci a validaci zesíťovaných peptidů. V této práci byla pro kovalentní modifikaci lysinů použita dvě činidla – disukcynyl suberát (DSS) a disukcynyl glutarát (DSG) (viz obr. 4.4).



Obr. 4.4 Struktura homobifunkčních činidel disukcynyl suberátu (DSS) a disukcynyl glutarátu (DSG). Délka raménka DSS je 11.4 Å a délka raménka DSG je 7.7 Å. Převzato z <<https://www.thermofisher.com/>>.

Proteiny (CaMKK2, CaMKK2-CaM) byly pomocí odsolovací kolony přeneseny do pufru obsahujícího 10mM HEPES (pH 7,5), 150mM NaCl, 0,1mM TCEP and 1mM CaCl₂. Chemické zesíťení bylo provedeno v přítomnosti dvou homobifunkčních síťovacích činidel DSS nebo DSG, která se nacházela ve směsi se svými 4x deuterovanými analogy v molárním poměru 1:1. Koncentrace zásobních roztoků činidel v DMSO byla 10 mg.ml⁻¹. K proteinům o finální koncentraci 1 mg.ml⁻¹ byl přidán 20násobný nebo 50násobný molární nadbytek síťovacích činidel DSS nebo DSG do celkového objemu 20 µl. Směsi byly inkubovány při 22 °C po dobu 1 hodiny.

Vzorky byly dále elektroforeticky separovány pomocí NuPAGE na gradientních 4–12% Bis-Tris gelech v prostředí 20x zředěného komerčního MES SDS pufru. Vzorky odpovídající velikostně monomerním zesíťovaným proteinům byly z gelu vyříznuty. Cysteiny byly redukovány pomocí 50mM DTT po dobu 45 min při teplotě 60 °C. Volné cysteiny byly ve tmě alkylovány prostřednictvím 100mM iodoacetamidu při laboratorní teplotě po dobu 30 min. Dále byly proteiny přes noc štěpeny pomocí trypsinu při 37 °C. Poměr enzymu a proteinu byl 1:20 (wt/wt). Peptidy extrahované z gelu byly nanaseny na Trap kolonu (ZORBAX 300SB-C18, 5 μ m, 5 × 0,3mm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), kde byly odsoleny po dobu 5 min při průtokové rychlosti 20 μ l.min⁻¹. Peptidy byly separovány na koloně s reverzní fází (ZORBAX SB C18 RR 3.5 μ m 150 × 0,3 mm, Agilent technologies, Santa Clara, USA) pomocí HPLC systému (Agilent technologies) při průtokové rychlosti 10 μ l.min⁻¹. Pro separaci byl použit následující gradient: 1–10% B po dobu 1 min, 10–45% B po dobu 19 min, 45–95% B po dobu 5 min. Rozpouštědlo A obsahovalo acetonitril a kyselinu mravenčí ve vodě v poměru 2%/0,1%. Rozpouštědlo B obsahovalo kyselinu mravenčí a acetonitril v poměru 0,1%/98%. Kolona byla zahřívána na 50 °C a přímo propojena s FT-ICR hmotnostním spektrometrem (15T solariX, Bruker Daltonics, Billerica, USA) za použití ionizace elektrosprejem. Přístroj byl v systému kalibrován s výslednou hmotnostní přesností pod 2 ppm.

Akvizice dat a jejich zpracování byla zajištěna pomocí programů ftmsControl 2.1.0 a DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, USA). Identifikace zesíťovaných peptidů byla provedena s využitím Links software (Young *et al.*, 2000). Při vyhledávání jednotlivých spojení byla zohledněna karbamidomethylace cysteinů a oxidace methioninů. Odchylka hmotností byla udržována pod hladinou 2 ppm a přiřazené fragmenty byly ověřeny manuálně. Měření byla realizována ve spolupráci s Dr. Petrem Pompachem (Biotechnologický ústav AV ČR, BIOCEV, Vestec), který se primárně podílel i na vyhodnocování dat.

4.3.5.3 Alkylace cysteinů spojená s hmotnostní spektrometrií

Alkylace cysteinů byla využita pro mapování povrchových cysteinů v rámci ASK1-TBD, které by mohly být potenciálně zapojeny do interakce s TRX1. Na základě kvantifikace míry alkylace lze odhadnout jejich přístupnost rozpouštědlu na povrchu

proteinu. Tato data byla nápomocná i pro upřesnění ASK1-TBD *ab initio* modelu (Sechi & Chait, 1998).

Redukovaná ASK1-TBD (15-20 μM) v pufru obsahujícím 20mM Tris (pH 7,5), 200mM NaCl a 5mM DTT byla smísena s 500mM iodoacetamidem (IAA) a inkubována ve tmě po dobu 30-60 min při laboratorní teplotě. Molární poměr IAA:DTT dosahoval 5:1. Výsledky alkylačních reakcí byly analyzovány pomocí MS/MS. Ten samý experiment byl proveden i v případě oxidované ASK1-TBD (oxidace dle postupu v kap. 4.3.1, str. 54). Zároveň byla alkylace provedena i za denaturujících podmínek v přítomnosti 8M urey.

Nejprve byla provedena MS analýza intaktního proteinu pro ověření oxidovaného nebo alkylovaného stavu. Proteiny byly primárně odsoleny pomocí Microtrap kolony (Optimize technologies, Oregon city, USA) a analyzovány pomocí FT-ICR hmotnostního spektrometru (15T solariX, Bruker Daltonics, Billerica, USA) za použití ESI. Pro detailní analýzu disulfidických vazeb byly použity dva odlišné přístupy hmotnostně spektrofotometrické analýzy. V jednom případě byla ASK1-TBD smísena s guanidine-hydrochloridem (finální koncentrace byla 3M) a nanесena na imobilizovanou pepsinovou kolonu, štěpení v rozmezí 3 min. Vzniklé peptidy byly odsoleny na koloně Peptide Microtrap (Optimize Technologies, Oregon, USA) a separovány na koloně s reverzní fází (ZORBAX 300SB-C18 3,5 μm , 0,5 \times 35 mm, Agilent, Santa Clara, USA) s použitím gradientu acetonitrilu 10-25% v rozmezí 8 min (s obsahem 0,4% kyseliny mravenčí). Výstup z kolony byl připojen k FT-ICR hmotnostního spektrometru (viz výše) s použitím ionizace elektrosprejem. V závislosti na typu vzorku byly jednotlivé typy modifikací (tvorba disulfidických můstků nebylo karbamidomethylace cysteinů) vyhledávány pomocí programu MASCOT proti databázi obsahující sekvenci ASK1-TBD.

Druhou alternativou bylo štěpení trypsinem po dobu 6 hod při 37°C a analýza pomocí HPLC-MS/MS. Po krátkém odsolení byly peptidy separovány v gradientu acetonitrilu (5-40% po dobu 40 min, 0,2% kyselina mravenčí) na analytické koloně s reverzní fází (Zorbax 300SB-C18 3,5 μm , 0,3 \times 150 mm, Agilent technologies). K analýze byl opět využíván program MASCOT. Peptidy spojené disulfidickým můstkem byly identifikovány pomocí programu Links a data zpracována s použitím

programu Data Analysis 4.2 (viz výše). Měření byla realizována ve spolupráci s Dr. Petrem Manem (Mikrobiologický ústav AV ČR, BIOCEV, Vestec).

Zóna odpovídající aduktu ASK1-TBD a TRX C35,73S byla vyřezána z gelu a modifikována pomocí IAA. Štěpení trypsinem a další analýza probíhala výše popsaným způsobem.

4.3.6 Diferenční skenovací fluorimetrie

Diferenční skenovací fluorimetrie byla v této práci použita k ověření strukturní stability proteinů po zavedení mutace. Tato metoda nachází uplatnění i při studiu vazby ligandu na protein, kdy ze série titrací a konstrukce vazebné křivky je možné zjistit důležitou biofyzikální veličinu K_d . Efekt je však patrný pouze pokud má daný ligand prokazatelný vliv na stabilitu daného proteinu (Vivoli *et al.*, 2014). V průběhu teplotní denaturace dochází k expozici hydrofobních oblastí do okolního roztoku a vazbě fluorescenční sondy Sypro Orange, což vyvolává její intenzivní fluorescence. S rostoucím teplotním gradientem je sledován nárůst fluorescence v podobě denaturační křivky. Inflexní body těchto sigmoidálních křivek odpovídají hodnotám teplot tání (T_m). Na základě porovnání hodnoty T_m u různých mutantních variant lze určit, zda nedošlo k dramatickým změnám struktury v důsledku mutace. Nevýhodou této metody je značení proteinu, které může u méně stabilních proteinů vést k jejich precipitaci. Možnou alternativou je měření DSF, při kterém se využívá vnitřní fluorescence proteinu.

Roztoky proteinu byly pipetovány do 96 jamkové mikrotitrační destičky. K proteinu o finální koncentraci $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ byl přidán $1 \text{ }\mu\text{l}$ 200x koncentrovaného fluorescenčního barviva Sypro Orange (Sigma-Aldrich, USA) do finálního objemu $25 \text{ }\mu\text{l}$. Měření byla prováděna v triplicátech. Destička byla přelepena fólií pro uchování čistoty vzorků a zabránění jejich evaporace v průběhu experimentu. Destička byla vložena do přístroje LightCycler 480 II cycler (Roche Applied Science, Německo), kde byl nastaven teplotní gradient $20\text{-}95 \text{ }^\circ\text{C}$ s rychlostí $0,01^\circ\text{C/s}$. Vlnová délka excitace byla 465 nm a vlnová délka emise byla 580 nm . Pomocí softwaru Roche LightCycler 480 SW 1.5 byla odečtena hodnota T_m , která odpovídá minimu první záporné derivace denaturační křivky.

4.3.7 CD spektroskopie

Cirkulární dichroismus je jev, který vzniká v důsledku rozdílné absorpce levotočivého a pravotočivého cirkulárně polarizovaného světla molekulou chromoforu, která je chirální nebo se nachází v chirálním okolí. Proteiny a nukleové kyseliny obsahují mnoho takových skupin, které bohatě přispívají k CD signálu. Tato metodika tedy nachází široké uplatnění při studiu konformačních změn proteinů v komplexu s ligandem, kontrole strukturní integrity po zavedení mutace nebo zastoupení jednotlivých typů sekundární struktury. Existují dvě spektrální oblasti, ve kterých lze pozorovat CD signál. Ve vzdálené oblasti UV (240-180 nm) signál pochází z absorpce peptidových vazeb a vzniklé spektrum v sobě skrývá informaci o obsahu jednotlivých prvků sekundární struktury proteinu. Naopak v blízké oblasti UV (320-260 nm) se projevují změny v terciární struktuře proteinů při vazbě ligandů. Signály v této oblasti vznikají v důsledku absorpce aromatickými aminokyselinami nebo disulfidickými vazbami (Kelly *et al.*, 2005).

Měření cirkulárního dichroismu byla provedena na dvou různých přístrojích a za mírně odlišných podmínek. Ve všech případech byla měřena CD spektra v blízké (250-320 nm) i vzdálené (200-260 nm) oblasti UV kvůli monitorování změn v sekundární i terciární struktuře při tvorbě komplexu.

1) ASK1-TBD a TRX1

Spektra ve vzdálené oblasti (far-UV) byla měřena v křemenné kyvetě s optickou drahou 1 mm (Starna, USA) a finální spektrum bylo získáno jako průměr 5 akumulací. Parametry měření byly následující: rychlost skenování byla 10 nm.min⁻¹, čas odezvy byl 8 s, rozlišení 1 nm, šířka pásma 1 nm a citlivost 100 mdeg (milidegree). U všech spekter byla provedena korekce pozadí. Finální koncentrace ASK1-TBD a TRX1 byla 8 μM. Výsledné spektrum bylo přepočítáno dle níže uvedeného vztahu a vyjádřeno pomocí střední zbytkové elipticity (Q_{MRW}):

$$Q_{MRW} = \frac{\theta_{obs} M_w}{c l N_R 10}, \quad (\text{Rovnice 3})$$

kde θ_{obs} představuje pozorovanou elipticitu v mdeg, M_w je molekulová hmotnost proteinu, c je proteinová koncentrace v mg ml⁻¹, l je optická dráha v cm a N_R je počet aminokyselin v proteinovém řetězci (Whitmore & Wallace, 2008). Analýza spektra

prostřednictvím metody K2D poskytla informace ohledně zastoupení prvků sekundární struktury. Měření probíhala při 22 °C v prostředí pufru s obsahem 20mM Tris (pH 7,5), 200mM NaCl a 2mM β -ME.

Spektra v blízké oblasti UV (near-UV) byla měřena v křemenné kyvetě s optickou drahou 1 cm (Starna, USA). Výsledné spektrum bylo získáno jako průměr 15 akumulací. Finální koncentrace ASK1-TBD a TRX1 byla 26 μ M.

Spektra ASK1-TBD a TRX1 byla měřena na J-810 spektropolarimetru (Jasco, Japonsko) ve spolupráci s Dr. Pavlínou Ullrichovou (VŠCHT, Praha).

2) pCaMKK2 + 14-3-3 γ

Měření cirkulárního dichroismu pCaMKK2 a jejího komplexu se 14-3-3 γ byla realizována ve spolupráci s Dr. Tatsianou Charnavets (Biotechnologický ústav AV ČR, BIOCEV, Vestec). Spektra byla měřena pomocí spektrometru Chirascan™-plus (Applied Photophysics, Velká Británie). Far-UV CD spektra byla měřena v křemenné kyvetě s optickou drahou 1 mm ve spektrální oblasti 200-260 nm. Koncentrace pCaMKK2 byla 1,6 μ M a koncentrace 14-3-3 γ byla 3,2 μ M. Signál byl zaznamenáván ve formě molární elipticity, která byla po korekci absorpčního pozadí přepočítána na střední zbytkovou elipticitu s užitím výše uvedeného vzorce (viz rovnice 3, str. 67). Program CDNN dostupný od výrobce spektrometru byl použit k analýze sekundární struktury. Near-UV CD spektra byla měřena v křemenné kyvetě s optickou drahou 1 cm ve spektrální oblasti 250-320 nm. Koncentrace pCaMKK2 byla 20 μ M a koncentrace 14-3-3 γ byla 40 μ M.

4.3.8 Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Časově rozlišená měření dohasínání intenzity a anizotropie fluorescence tryptofanu byla realizována ve spolupráci s prof. Petrem Heřmanem a doc. Jaroslavem Večeřem z MFF UK. Měření byla provedena na časově-korelovaném jednofotonovém čítacím přístroji, který zahrnoval femtosekundový excitační Ti:safírový laser (Chameleon Ultra II a Pulse Picker HP, Coherent) a časově-korelovaný detektor s chlazeným fotonásobičem MCP-PMT (R3809U-50, Hamamatsu). Tryptofanová emise byla stimulována na 298 nm a měřena při 355 nm s použitím monochromátoru

a souboru skleněných filtrů UG1 a BG40 (Thorlabs) umístěných před vstupní štěrbinou. Dohasínání fluorescence byla zaznamenávána v 1024 kanálech s časovým rozlišením 50 ps/kanál, dokud nebylo dosaženo množství 10^5 v jednom dohasínání. Vzorky tryptofanových mutantů (oxidovaných dle postupu v kap. 4.3.1, str. 54) ASK1-TBD F242W a F175W (15 μ M) byly umístěny do termostatického držáku a všechny experimenty byly provedeny při 23 °C v pufru obsahujícím 20mM Tris (pH 7,5) a 200mM NaCl.

Dohasínání intenzity fluorescence bylo měřeno pod „magickým úhlem“, kde její intenzita $I(t)$ není ovlivněna rotačním pohybem fluoroforu. Za předpokladu multiexponenciálního dohasínání, lze celkovou intenzitu dohasínání vyjádřit jako součet exponenciálních funkcí:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (\text{Rovnice 4})$$

kde τ_i jsou doby života excitovaných stavů a α_i příslušné amplitudy. Dekonvoluce byla provedena metodou maximální entropie (Vecer & Herman, 2011). Výpočet poskytl set amplitud α_i reprezentujících distribuci dob života τ_i . Obvykle bylo vybráno 100 dob života rovnoměrně rozmístěných v logaritmické škále od 20 ps do 20 ns. Střední doba života excitovaného stavu fluoroforu τ_{mean} byla vypočítána:

$$\tau_{mean} = \sum_i f_i \tau_i = \sum_i (\alpha_i \tau_i^2) / \sum_i (\alpha_i \tau_i) \quad (\text{Rovnice 5})$$

Kde f_i jsou frakční intenzity odpovídajících komponent dob života.

Dohasínání anizotropie fluorescence $r(t)$ bylo získáno simultánním měřením a zpětnou konvolucí rovnoběžných a kolmých komponent intenzity, $I_{||}(t)$ a $I_{\perp}(t)$. Vyhodnocení proběhlo výše popsaným způsobem s použitím metody maximální entropie. Anizotropie byla získána jako součet exponenciálních komponent:

$$r(t) = \sum_i \beta_i \cdot \exp\left(-\frac{t}{\phi_i}\right), \quad (\text{Rovnice 6})$$

kde β_i jsou amplitudy, které reprezentují distribuci korelačních časů ϕ_i . Součet amplitud udává hodnotu počáteční anizotropie r_0 :

$$r_0 = \sum_i \beta_i, \quad (\text{Rovnice 7})$$

Obvykle bylo vybráno 100 korelačních časů rovnoměrně rozmístěných v logaritmické škále od 100 ps do 200 ns.

4.3.9 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

Maloúhlový rozptyl rentgenového záření se v poslední dekádě dostává v oblasti strukturní biologie na výsluní díky rostoucímu vývoji instrumentace a nových algoritmů, které zjednodušují sběr a analýzu dat. Silná stránka této strukturní techniky spočívá v aplikaci při studiu flexibilních, slabě interagujících makromolekul nebo dynamických procesů. Nespornou výhodou je možnost studovat biologické procesy v jejich přirozeném prostředí (Graewert & Svergun, 2013). Oproti krystalografii nebo NMR je sběr dat i kvalitativní charakterizace vzorku mnohem rychlejší a proto je tato metoda používána i při screeningu krystalizačních podmínek a validaci strukturních modelů (Bonneté *et al.*, 1999; Mertens & Svergun, 2010).

Během experimentu jsou makromolekuly v roztoku vystaveny rentgenovým paprskům, které interagují s elektronovými obaly atomů a poskytují informaci ohledně fluktuace elektronové hustoty. Vzhledem k dynamickému pohybu molekul je většina paprsků rozptýlena do všech směrů, ale při měření pod nízkým rozptylovým úhlem je možné získat informaci ohledně velikosti a tvaru makromolekuly. Intenzita rozptýleného záření z monodisperzního roztoku makromolekul je přímo úměrná sféricky zprůměrovanému rozptýlenému záření z jediné částice $I(s) \sim \langle A^2(s) \rangle_\Omega$ (funkce rozptylového vektoru s ($s = 4\pi \sin\theta/\lambda$, kde 2θ je úhel mezi dopadajícím a rozptýleným paprskem)) (Svergun, 2002, 1999). Fundamentálním problémem této metody zůstává nízká informační obsažnost signálu, který rapidně klesá s rostoucím rozptylovým vektorem s a proto lze získat pouze struktury s nízkým rozlišením. Jediné strukturní parametry, které lze získat přímo ze SAXS křivky, je maximální vzdálenost v rámci částice (D_{\max}), gyrační poloměr (R_g), hydratovaný objem částice (V_p) a molární hmotnost (MM) (Mertens & Svergun, 2010; Svergun, 1999). Gyrační poloměr může být přímo určen z tzv. Guinierovy aproximace při nízkých úhlech, která v případě monodisperzního vzorku (bez přítomnosti agregace) vykazuje lineární závislost a je tedy dobrým měřítkem kvality vzorku (Guinier, 1939; Mertens & Svergun, 2010). Přitažlivé či odpudivé interakce mezi molekulami často vedou k nepřesnému odhadu

těchto parametrů. Pro identifikaci optimálních podmínek, kde jsou tyto interakce minimalizovány, jsou data sbírána při různých koncentracích makromolekul. Z porovnání intenzity v přímém směru a známé koncentrace makromolekul s rozptylem u známého standardu lze navíc určit molekulovou hmotnost dané částice. Alternativně může být hodnota MM odhadnuta na základě znalosti hydratovaného objemu molekuly z Porodovy rovnice, která poskytuje tu výhodu, že není zatížena nepřesnostmi v určení koncentrace (Glatter a Kratky, 1982). Kratkyho výnos ($((sR_g)^2 I(s)/I(0))$ v závislosti na sR_g) nám poskytuje informaci ohledně kompaktního tvaru proteinu. Pro plně sbalené proteiny tato funkce klesá se čtvrtou mocninou rozptylového vektoru a průběh funkce kopíruje tvar píku. Naproti tomu denaturované proteiny vykazují téměř lineární nárůst při vyšších hodnotách rozptylových úhlů (Doniach, 2001).

Důležitým prvkem analýzy je získání distribuční funkce meziatomových vzdáleností, která lze získat z rozptylové křivky pomocí nepřímé Fourierovy transformace (Glatter, 1977). Maximální rozpětí této distribuční funkce právě poskytuje hodnotu D_{\max} , která je klíčová pro *ab initio* rekonstrukci molekulové obálky.

Cílem *ab initio* modelování je rekonstrukce trojrozměrné molekulové obálky ze SAXS křivky. K těmto účelům slouží program DAMMIN (z angl. Dummy Atom Model Minimisation) (Svergun, 1999). Na počátku této analýzy je obvykle sférický objem hustě vyplněný M počtem malých koulí o určitém rozměru. Maximální rozměr tohoto objemu je omezen experimentálně určeným D_{\max} . Každé kouli jsou náhodně přidělovány indexy pro rozpouštědlo (index = 0) nebo částici (index = 1), což vede ke konstrukci tvaru částice v podobě binární soustavy koulí X o délce M . Rekonstrukce tvaru je řízena z počáteční náhodné aproximace do finální podoby metodou simulovaného žíhání, dokud se nedosáhne významné statistické shody mezi rozptylovou funkcí vypočítané obálky a experimentálními daty (Kirkpatrick *et al.*, 1983).

1) ASK1-TBD + TRX1

Akvizice dat z maloúhlového rozptylu rentgenového záření byla provedena v Laboratoři evropské molekulární biologie na synchrotronu DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron, PETRA III, P12 beamline, Německo). Vzorky byly měřeny

v rozmezí koncentrací: ASK1-TBD 1,2-4,6 mg.ml⁻¹; TRX1 1,4-12 mg.ml⁻¹; komplex ASK1-TBD:TRX1 1,5-11,9 mg.ml⁻¹. Po normalizaci intenzity prošlého paprsku byla data zprůměrována a byl odečten příspěvek pufru s použitím programu PRIMUS (Konarev *et. al*, 2003). Intenzita rozptylu v přímém směru $I(0)$ (pod nulovým úhlem) a gyrační poloměr R_g byly odečteny pomocí Guinierovy aproximace (Guinier, 1939). Distribuční funkce vzdálenosti $P(r)$ byla získána s pomocí programu GNOM, který funguje na principu nepřímé Fourierovy transformace (Svergun, 1992). Maximální rozptyl této funkce určuje maximální vzdálenost částice D_{max} . Molekulové hmotnosti rozpuštěných látek (MM_{exp}) byly získány po srovnání intenzity rozptylu v přímém směru s rozptylem referenčního roztoku hovězího sérového albuminu (molární hmotnost 66 kDa). *Ab initio* molekulární obálky byly vytvořeny s použitím programu DAMMIN (Svergun, 1999), který reprezentuje protein skupinou koulí o velikosti průměrné aminokyseliny. Výpočet obálky byl limitovaný získanou maximální vzdáleností D_{max} . Několik různých iterací reprezentující možnou obálku bylo zprůměrováno pomocí programu DAMAVER (Volkov & Svergun, 2003).

2) pCaMKK2 + 14-3-3 γ Δ C

Akvizice dat z malouhlového rozptylu rentgenového záření byla provedena v pufru obsahujícím 50mM Tris (7,5), 150mM NaCl, 1mM TCEP, 1mM CaCl₂ a 3% (w/v) glycerol. Vzorky byly měřeny v rozmezí koncentrací: pCaMKK2 1–2,8 mg.ml⁻¹; 14-3-3 γ Δ C 1,5–3 mg.ml⁻¹; komplex pCaMKK2:14-3-3 γ 14-3-3 γ Δ C (1:2 molární stechiometrie) 9,9–16,9 mg.ml⁻¹. Distribuční funkce vzdáleností byla opět získána prostřednictvím programu GNOM a Porodův objem (V_p) byl vypočten v programu PRIMUS. Intenzita rozptylu v přímém směru $I(0)$ a gyrační poloměr R_g byly odečteny pomocí Guinierovy aproximace. Zdánlivé molekulové hmotnosti rozpuštěných látek (MM_{exp}) byly získány po srovnání intenzity rozptylu v přímém směru s rozptylem referenčního roztoku hovězího sérového albuminu a paralelně i z Porodova objemu. *Ab initio* molekulární obálky byly vypočteny v programu GASBOR. Dvacet nezávislých iterací bylo zprůměrováno do jedné reprezentativní struktury s pomocí softwaru DAMAVER. Multifázové modelování komplexu CaMKK2 S100-14-3-3 γ bylo provedeno v programu MONSA (Svergun, 1999). Rigidní modelování bylo realizováno s pomocí programu CORAL (Petoukhov *et al*, 2012a). Výchozími strukturami pro modelování

byla krystalová struktura kinasové domény CaMKK2 (PDB kód 5UY6) a 14-3-3 γ (PDB kód 2B05). Analýza na základě souborné optimalizační metody (EOM – z angl. Ensemble Optimization Method) byla provedena v programu EOM (Bernadó *et al.*, 2007).

3) CaMKK2 a Ca²⁺/CaM

Analýza dat z malouhlového rozptylu světla zahrnovala obvyklé postupy jako v případě analýzy komplexu CaMKK2:14-3-3 γ . Měření byla provedena v totožném pufru a pro různé koncentrační série individuálních komponent a komplexu: CaMKK2 2,3–5 mg.ml⁻¹; CaM 0,8–3,9 mg.ml⁻¹ a komplex CaMKK2:Ca²⁺/CaM 2,4 – 10,7 mg.ml⁻¹ (1:1 molární stechiometrie).

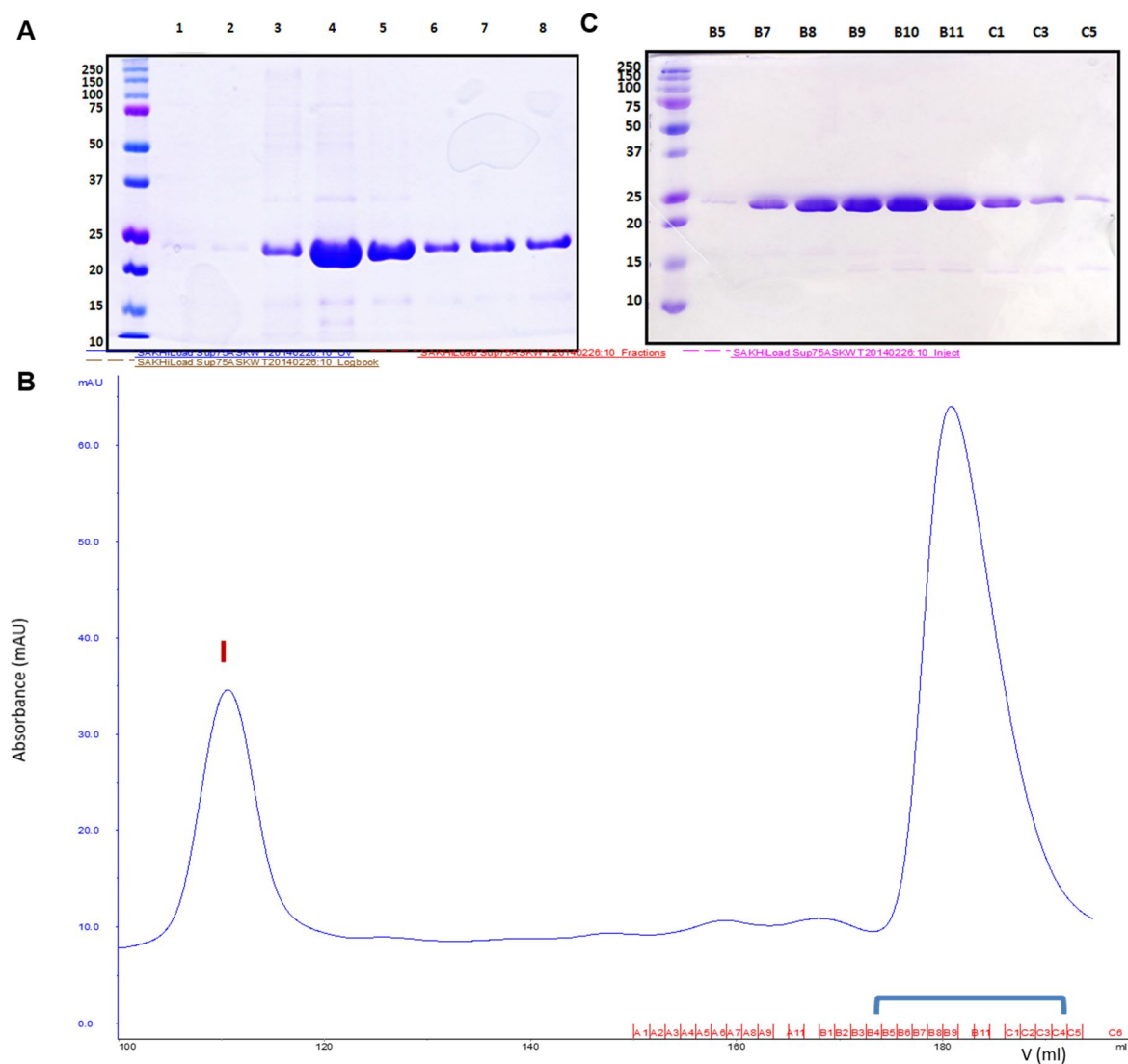
5 VÝSLEDKY

5.1 Exprese a purifikace

5.1.1 ASK1-TBD

Na základě predikce sekundární struktury byly pro studium thioredoxin-vazebné domény ASK1 (ASK1-TBD) navrženy její kratší verze (46-302, 88-302, 46-322 a 88-322). Optimální výtěžky, kvalitu a čistotu poskytla pouze exprese a purifikace konstruktu ASK1 88-302. Protein byl exprimován zpravidla v 6l TB média při 25°C přes noc pomocí leakage exprese. Purifikace probíhala dvoustupňově, pomocí niklové chelatační chromatografie a gelové permeační chromatografie na koloně Hiload 26/60 Sup 75 (viz obr 5.1, str. 75). Standardní výtěžky z tohoto množství se pohybovaly kolem 1,5 mg na 1l TB média. Čistota a integrita proteinu byla dostačující pro další experimenty, jak je patrné z obr. 5.1 A a 5.1 C. Protože ASK1-TBD migrovala mírně rychleji, byl vzorek ověřen pomocí MS. LC-MS/MS analýza potvrdila, že se nejedná o produkt degradace, ale o její celistvou formu.

V této práci bylo připraveno stejným postupem 7 cysteinových mutantů ASK1-TBD (C120S, C185S, C200S, C206S, C225S, C226S, C250S) s cílem studovat jejich význam při interakci s TRX1. Purifikace cysteinových mutantů ASK1-TBD byla provedena ve spolupráci s Dr. Katarínou Pšenákovou a výtěžky byly srovnatelné s ASK1-TBD WT. Nižší výtěžek byl zaznamenán pouze v případě mutantu C120S, který pravděpodobně souvisí s jeho teplotní nestabilitou (ověřeno měřením DSF, viz tab 5.1, str. 90). Dr. Veronika Obšilová připravila tryptofanové mutanty F132W, F175W, F242W a F272W pro strukturní studie.



Obr. 5.1 *Souhrn purifikace ASK1-TBD.* **A** – Vizualizovaný 15% (w/w) gel z SDS-PAGE analýzy frakcí z niklové chelatační chromatografie. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). **B** – Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii ASK1-TBD na koloně Hiload 26/60 Sup 75 s rychlostí průtoku 2 ml/min. Pozice mrtvého objemu kolony je označena červenou značkou. **C** – Vizualizovaný 15% (w/w) gel z SDS-PAGE analýzy frakcí získaných z gelové permeační chromatografie. Frakce B5-C5 obsahují protein, jehož zóna migrace odpovídá relativní molekulové hmotnosti ASK1-TBD s C-koncovou histidinovou kotvou (~25500).

5.1.2 TRX1

Lidský thioredoxin TRX1 C73S byl exprimován zpravidla ve 3l LB média při 30°C pomocí IPTG indukce přes noc. Dále byl protein purifikován prostřednictvím niklové chelatační chromatografie a gelové permeační chromatografie na Sup 75 10/300 GL (viz obr. 5.2, str. 77).

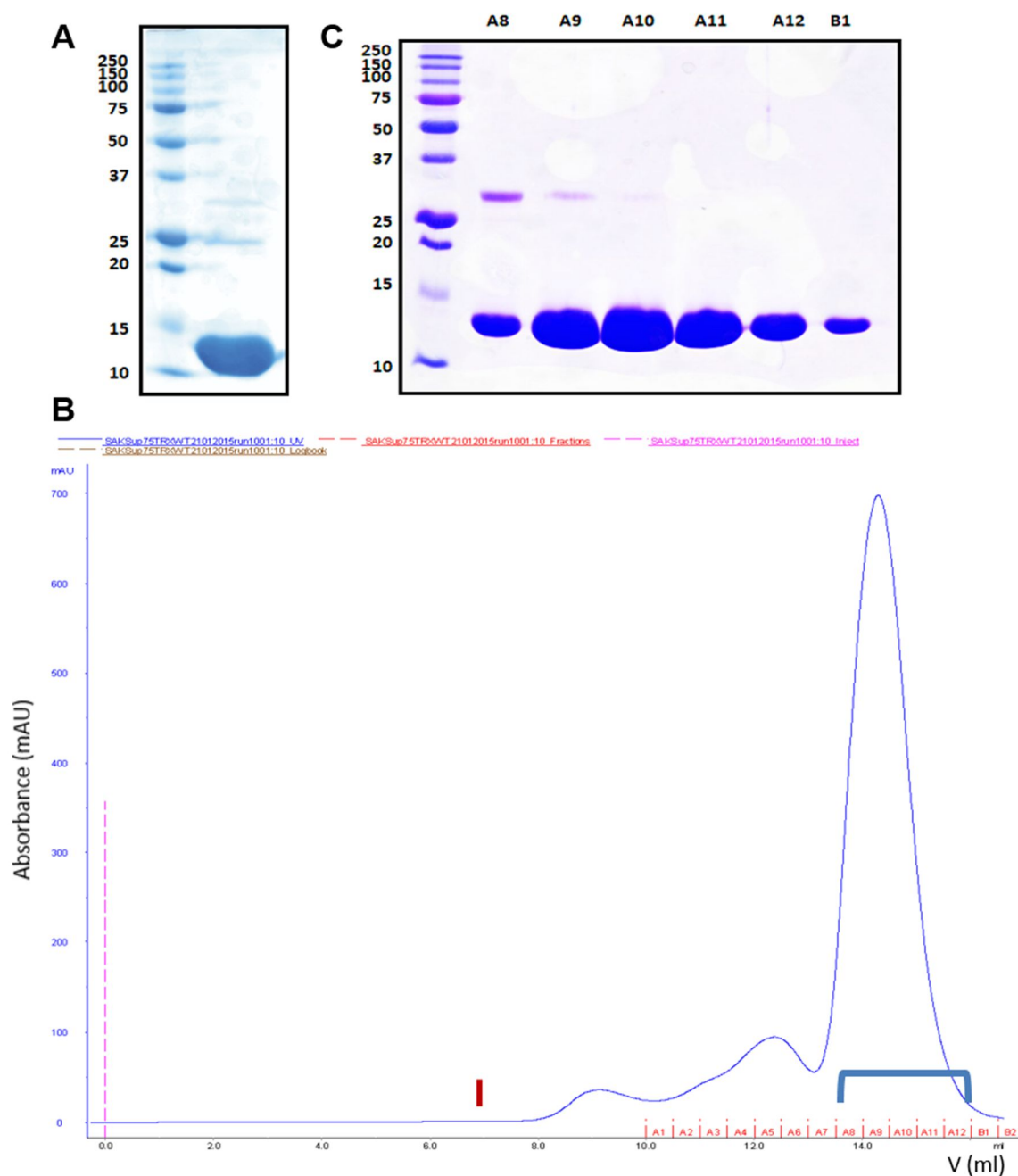
Po gelové filtraci byly sloučeny frakce A9-B1 (viz obr. 5.2 C), které obsahovaly protein s minimálním výskytem nečistot. Výsledná čistota a integrita vzorku byla vhodná pro další studie.

Mutantní forma TRX C73S je v této práci nazývána jako TRX1. Dále byl připraven i TRX1 WT s pěti cysteiny, od něhož byly odvozeny další mutanty, konkrétně C32S, C35S, C62S, C69S. Pro studium vlivu tryptofanu v blízkosti aktivního centra při interakci s ASK1 byl připraven mutant W31F. Výťažky všech mutantů byly srovnatelné s WT, tedy přibližně 6 mg na 1l LB média.

5.1.3 CaMKK2

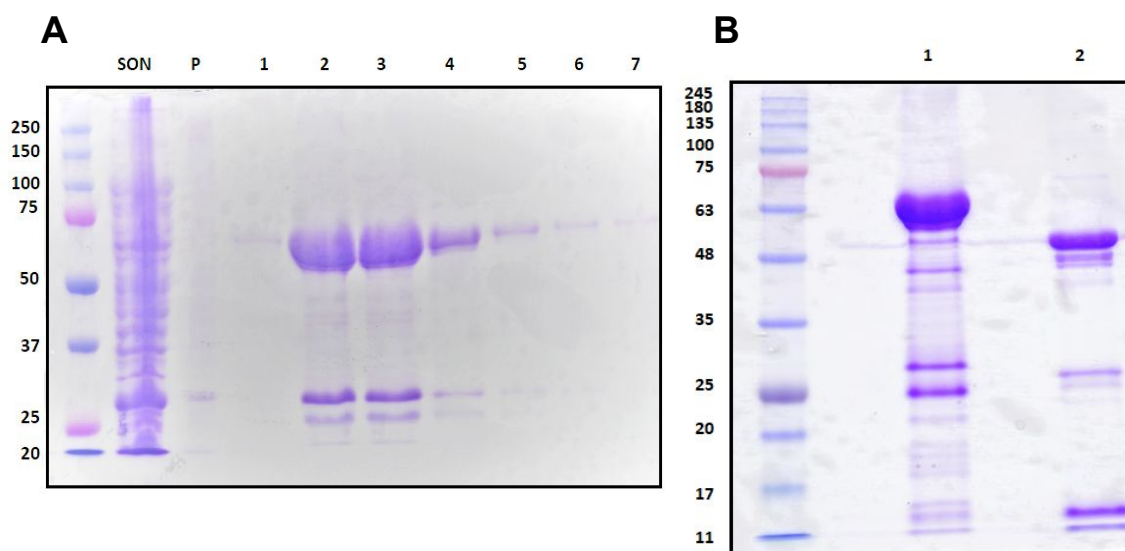
V rámci tohoto projektu byla pozornost soustředěna na úlohu fosforylačních míst Ser¹⁰⁰ a Ser⁵¹¹ v interakci se 14-3-3 proteinem. Z toho důvodu byl proces fosforylace na mnoha dalších místech nežádoucím elementem. S cílem potlačit tento jev byla mutageneze cílena na konzervovaný DFG motiv proteinkinas za vzniku katalyticky inaktivního mutantu CaMKK2 D330A, který byl použit jako templát pro další mutantní varianty CaMKK2 S100 a CaMKK2 S100,511². Ostatní PKA místa (Thr¹⁴⁵ a Ser⁴⁹⁵) byly nahrazeny alaninem. Expres CaMKK2 (93-517) byla provedena ve 4l autoindukčních medií ZY při 20 °C po dobu 17 hod. Purifikace byla provedena v několika krocích, pomocí niklové chelatační chromatografie (viz obr. 5.3 A, str. 78) a gelové permeační chromatografie.

² S100 – varianta CaMKK2 (93-517) T145A, D330A, S495A S511
S100,511 – varianta CaMKK2 (93-517) T145A, D330A, S495A



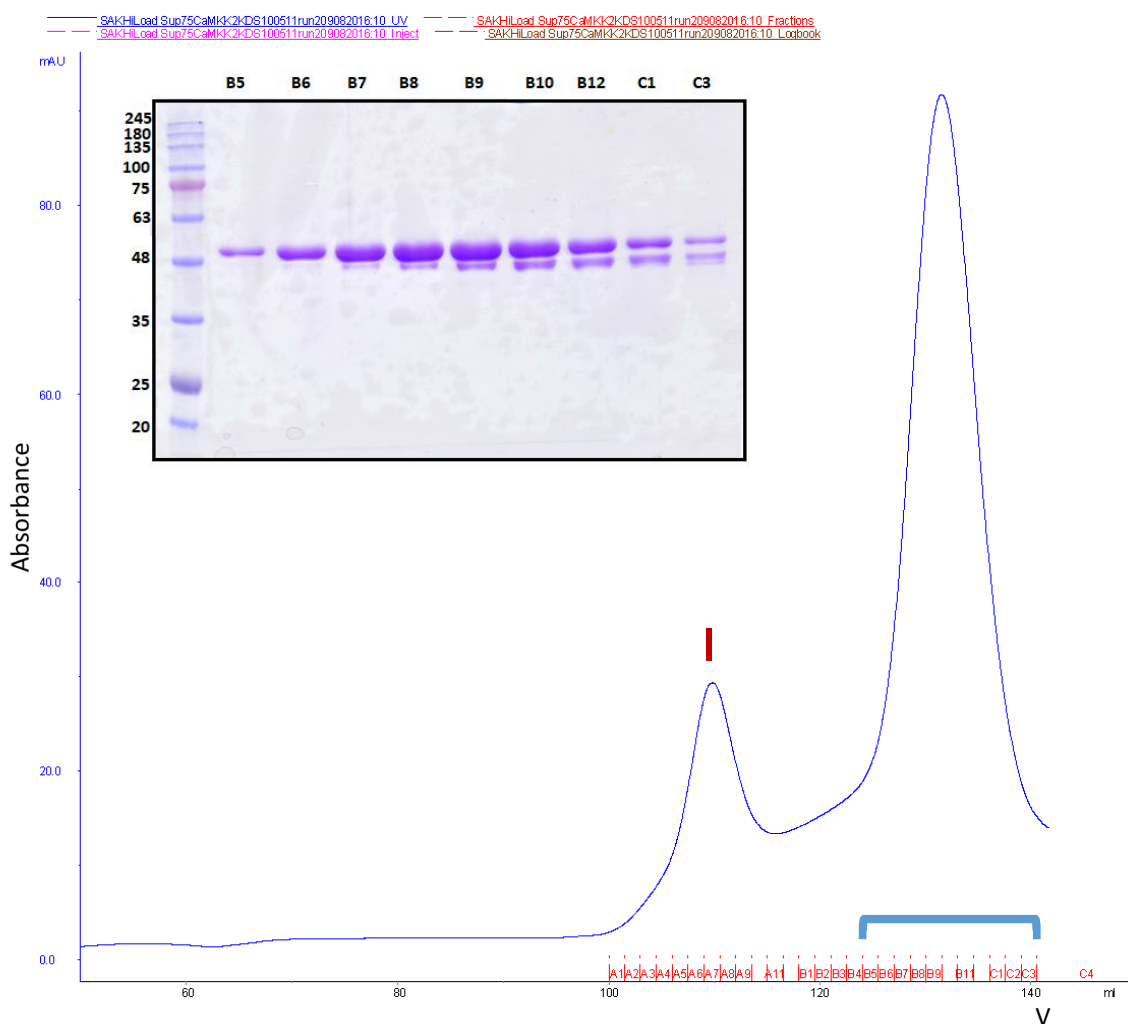
Obr. 5.2 *Souhrn purifikace TRX1.* **A** – Vizualizovaný 15% (w/w) gel z SDS-PAGE analýzy po niklové chelatační chromatografii. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). **B** – Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii TRX1 na koloně Sup 75 10/300 GL s rychlostí průtoku 0,5 ml/min. Pozice mrtvého objemu kolony je označena červenou značkou. **C** – Vizualizovaný 15% (w/w) gel z SDS-PAGE analýzy frakcí z gelové permeační chromatografie. Frakce A8-B1 obsahují protein, jehož zóna migrace odpovídá relativní molekulové hmotnosti TRX1 s N-koncovou histidinovou kotvou (~ 13000).

Po niklové chelatační chromatografii byl protein dialyzován a druhý den byla pomocí TEV proteasy odštěpena fúzní kotva – 6×His-G_B1 protein (obr. 5.3 B). Další purifikační krok byl proveden na koloně Hiloal 26/60 Sup75 (viz obr. 5.4, str. 79). Frakce, které obsahovaly produkt degradace v minimálním množství (A5-B9) byly sloučeny a protein byl fosforylován pomocí komerční PKA.

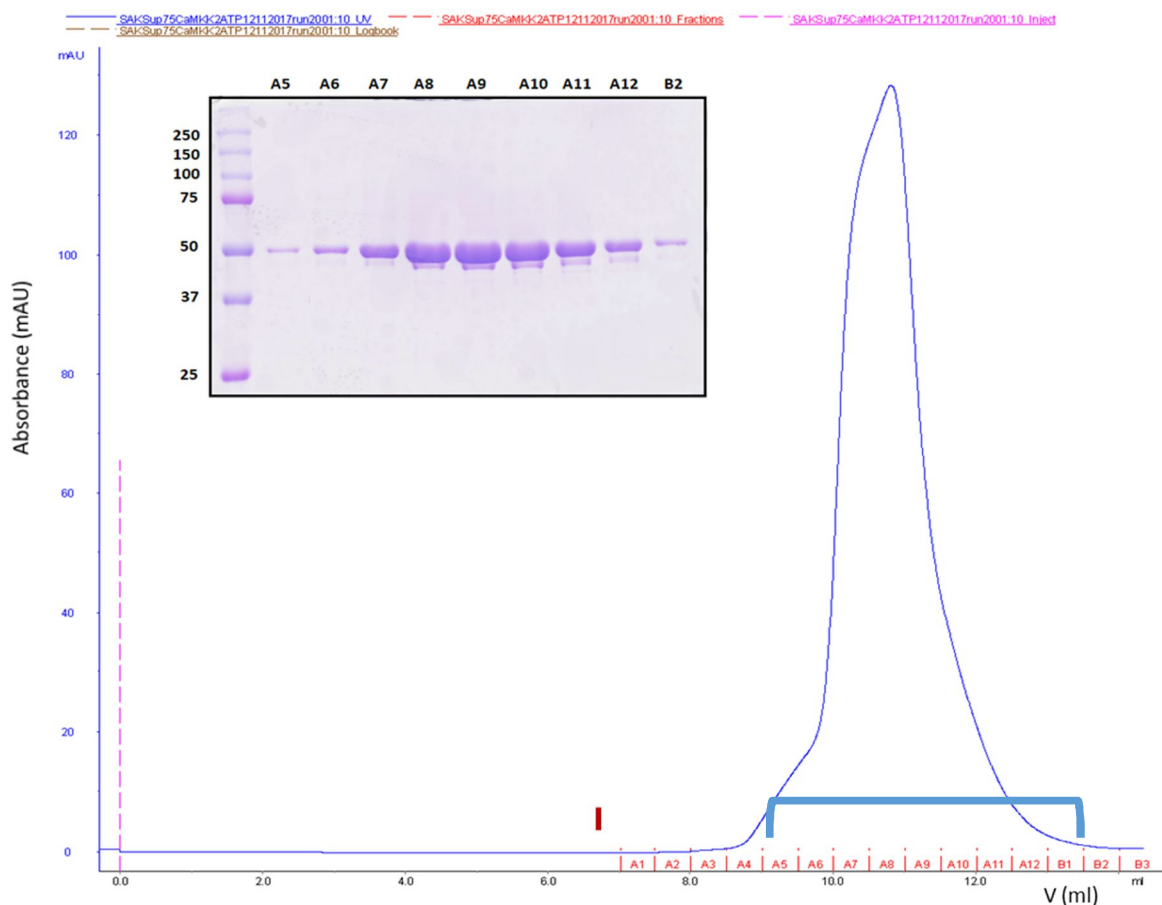


Obr. 5.3 12% (w/w) vizualizované gely z SDS-PAGE. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). **A** – Analýza frakcí po niklové chelatační chromatografii CaMKK2 S100. Do druhé a třetí dráhy byl nanesen vzorek sonikátu a pelety. Dráhy 2-7 obsahují protein, jehož zóna migrace odpovídá relativní molekulové hmotnosti fúzního proteinu CaMKK2 S100 s GB_1 proteinem a histidinovou kotvou (~ 56000). **B** – Štěpení fúzního proteinu TEV proteasou po dobu 1 hod při 30°C. Dráha 1 obsahuje vzorek před štěpením. Zóna migrace CaMKK2 S100 odpovídá jeho relativní molekulové hmotnosti (~ 47500).

Reziduální ATP bylo po fosforylační reakci odstraněno pomocí gelové permeační chromatografie, tentokrát na koloně Sup 75 Increase 10/300 GL (viz obr. 5.5, str. 80). Výsledný protein byl získán již v optimální čistotě pro další experimenty. Fosforylační status byl ověřen pomocí hmotnostní spektrometrie. Degradace proteinu je známkou exprese proteinu v *E. coli*, ale z důvodu rychlého průběhu purifikace se podařilo tento jev omezit na minimum.



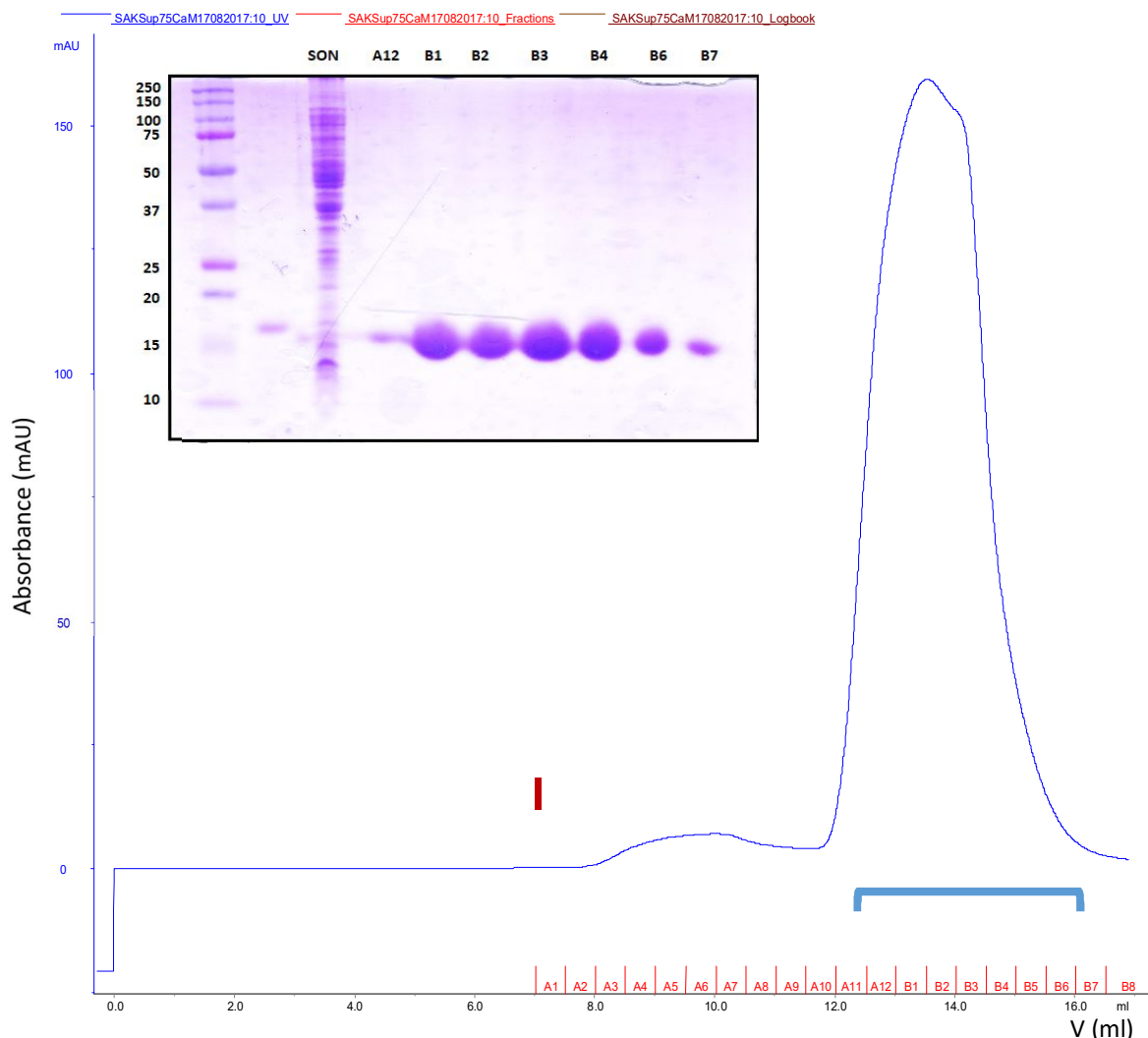
Obr. 5.4 Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii CaMKK2 S100 na koloně Hiloal 26/60 Sup 75 s rychlostí průtoku 2 ml/min. Pozice mrtvého objemu kolony je vyznačena červenou značkou. Vložený obrázek představuje 12% (w/w) vizualizovaný gel z SDS-PAGE analýzy frakcí B5-C3 (vyznačeno v chromatogramu). Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Zóna migrace odpovídá relativní molekulové hmotnosti CaMKK2 S100 (~ 47500).



Obr. 5.5 Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii CaMKK2 S100 na koloně Sup 75 Increase 10/300 GL s rychlostí průtoku 0,5 ml/min. Pozice mrtvého objemu kolony je vyznačena červenou značkou. Vložený obrázek představuje 12% (w/w) vizualizovaný gel z SDS-PAGE analýzy frakcí A5-B2 (vyznačeno v chromatogramu). Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Zóna migrace odpovídá relativní molekulové hmotnosti CaMKK2 S100 (~ 47500).

5.1.4 CaM

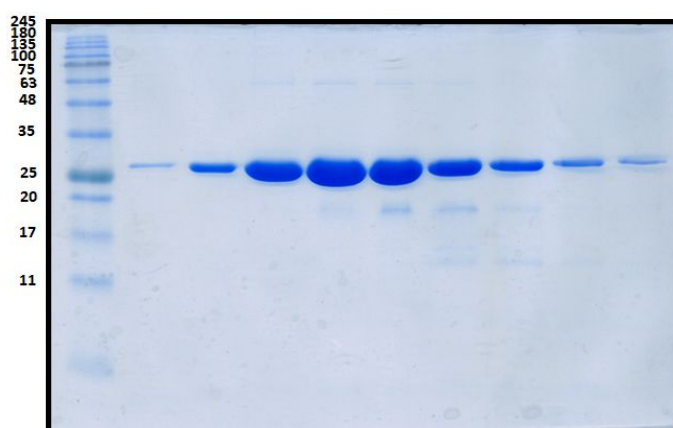
Potkaní forma kalmodulinu byla exprimována pomocí IPTG indukce v 6l LB média při 25 °C po dobu 12 hod. Protein byl purifikován pomocí hydrofóbní interakční chromatografie a gelové permeační chromatografie na koloně Sup 75 Increase 10/300 GL. Standarní výtěžek z 1l LB média byl 2 mg. Výsledná čistota proteinu byla optimální pro další studie (viz obr. 5.6, str. 81).



Obr. 5.6 *Souhrn purifikace kalmodulinu.* Chromatogram eluce při gelové permeační chromatografii kalmodulinu na koloně Sup 75 Increase s rychlostí průtoku 0,5 ml/min. Pozice mrtvého objemu kolony je vyznačena červenou značkou. Vložený obrázek představuje 15% (w/w) vizualizovaný gel z SDS-PAGE analýzy v průběhu purifikace. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Druhá dráha obsahuje vzorek po hydrofobní interakční chromatografii a třetí dráha vzorek sonikátu. Dráhy 3–9 odpovídají frakcím A12–B7 (vyznačeno v chromatogramu). Zóna migrace odpovídá relativní molekulové hmotnosti CaM (~ 17000).

5.1.5 14-3-3 γ

DNA lidské izoformy 14-3-3 γ (1-247) nebo jeho kratší verze 14-3-3 $\gamma\Delta C$ (1-234) s N-koncovou histidinovou kotvou a TEV štěpným místem byla klonována do plasmidu pET-15b mezi místa NdeI a BamHI. Protein byl exprimován prostřednictvím IPTG indukce při 30 °C a 190 ot/min po dobu 17 hod. Po niklové chelatační chromatografii a štěpení TEV proteasou byl předialyzován do pufru obsahujícího 50mM Tris (pH 7,5), 1mM EDTA, 1mM DTT a 10 % (w/v) glycerol. Protein byl nanášen na kolonu MonoQ (GE Healthcare, USA) v nepřítomnosti NaCl (u méně stabilních proteinů se používá nízká koncentrace NaCl, např. 10mM), aby mohlo dojít k jeho efektivní vazbě na nosič na základě elektrostatické interakce. Eluce probíhala v pufru 50mM Tris (pH 8,0), 1mM DTT s gradientem NaCl (0-1M) v časovém rozmezí 20 minut. Protein byl dále purifikován pomocí gelové permeační chromatografie na koloně Hiloal 26/60 Sup 75 v pufru obsahujícím 20mM Tris (pH 7,5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 5mM DTT a 10% (w/v) glycerol. Protein 14-3-3 γ , 14-3-3 $\gamma\Delta C$ byly připraveny Mgr. Danou Kalábovou a Mgr. Olívií Petrvalskou. Standardní výtěžky se pohybovaly kolem 10 mg na 1 l LB média. Finální čistota proteinu byla uspokojivá pro další experimenty (viz obr. 5.7). Fotografie gelu byla převzata od Mgr. Olívie Petrvalské.



Obr. 5.7 15% (w/w) vizualizovaný gel z SDS-PAGE analýzy frakcí po gelové permeační chromatografii na koloně Hiloal 26/60 Sup 75 s rychlostí průtoku 2 ml/min. Do první dráhy byl nanesen standard molekulových vah (uvedená relativní molekulová hmotnost je vydělena faktorem 1000). Zóna migrace proteinu odpovídá relativní molekulové hmotnosti 14-3-3 γ (~28400).

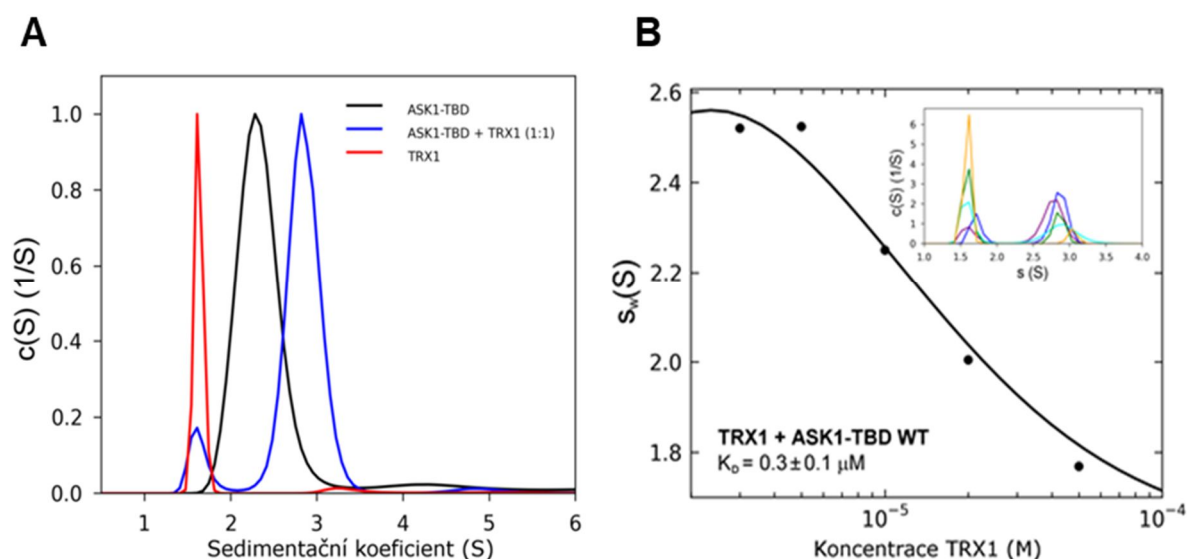
5.2 Biofyzikální a strukturní charakterizace komplexu ASK1-TBD:TRX1 za redukujících podmínek

5.2.1 Sedimentační analýza ASK1-TBD a TRX1

Jedním z cílů této práce bylo objasnění regulačního mechanismu ASK1-TBD skrze vazbu buněčného redoxního senzoru - TRX1. V první řadě byla charakterizace vzájemné interakce provedena v redukčním prostředí. Narušení redukční rovnováhy vlivem oxidativního stresu a dalších podnětů by mělo vést k disociaci komplexu a aktivaci ASK1. Záměrem sedimentační analýzy bylo tedy stanovení vazebné afinity a vazebné stechiometrie v redukčních nebo oxidujících podmínkách.

Měření za redukčních podmínek byla provedena při 48000 ot.min⁻¹ v pufru obsahujícím β -ME. V důsledku nízké absorpance obou proteinů byla k analýze použita data získaná interferenční optikou. Existoval zde i jistý předpoklad, že by interakce mohla být zprostředkována mezi určitými cysteiny obou proteinů. Z toho důvodu byly provedeny série experimentů, kde byla porovnána vazebná afinita mezi ASK1-TBD WT a TRX1 mutantů nebo naopak mezi cysteinovými mutanty ASK1-TBD a TRX1 WT.

Z distribuční funkce sedimentačních koeficientů na obr. 5.8 A (viz str. 84) je patrné, že ASK1-TBD tvoří s TRX1 komplex, jehož vážený průměrný sedimentační koeficient $s_{w(20,w)}$ (zkomigovaný na 20 °C a hustotu vody) je 3,0 S. Hodnota koeficientu pro samotnou ASK1-TBD činila 2,4 S a koeficient pro TRX1 byl 1,6 S. Hodnoty sedimentačních koeficientů samotných proteinů odpovídají molekulové hmotnosti ~25 a ~12 kDa, což je v souladu s teoretickou molekulovou hmotností monomerů TRX1 (~12,99 kDa) a ASK1-TBD (~ 25,57 kDa). Hodnota sedimentačního koeficientu komplexu, odpovídající molekulové hmotnosti ~ 33 kDa, napovídá, že ASK1-TBD a TRX1 tvoří komplex v molárním poměru 1:1 (teoretická molekulová hmotnost ~ 38,5 kDa).



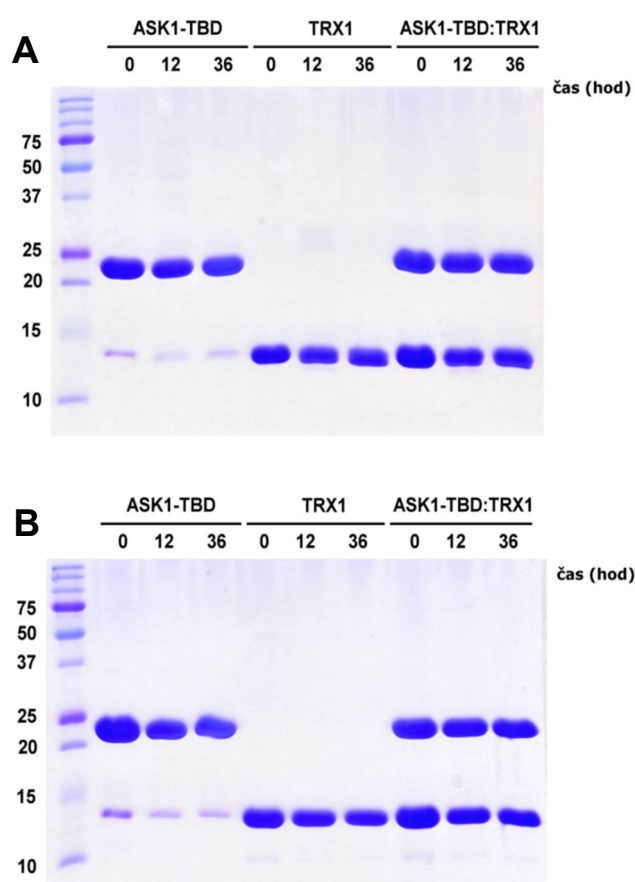
Obr. 5.8 Biofyzikální charakterizace interakce mezi ASK1-TBD a TRX1 za redukujících podmínek metodou sedimentačních rychlostí. **A** – Normalizovaná kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro ASK1-TBD (černá), TRX1 (červená) a ASK1-TBD a TRX1 smísených v poměru 1:1 (modrá). **B** – izoterma vážených průměrů sedimentačních koeficientů s_w (dále jen izoterma s_w) získaná z měření sedimentační rychlosti směsi ASK1-TBD ($5\mu\text{M}$) a TRX1 ($3\text{--}50\mu\text{M}$). Vložený obrázek představuje kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ za různých podmínek měření (koncentrace a různé molární poměry), jejichž integrací byly získány hodnoty s_w

K získání parametru vzájemné vazebné afinity v podobě zdánlivé disociační konstanty K_D byla provedena titrace ASK1-TBD thioredoxinem v 5 různých molárních poměrech (ASK1-TBD: TRX1 5:3, 1:1, 1:2, 1:4 a 1:10) při neměnné koncentraci ASK1-TBD ($5\mu\text{M}$).

Na obr. 5.8 B je vynesena izoterma komplexu ASK1-TBD a TRX1 za redukujících podmínek, jejíž nejlepší výpočet s aplikací 1:1 Langmuirova vazebného modelu poskytl hodnotu $K_D \sim 0,3 \pm 0,1\mu\text{M}$. Výsledky analýzy byly verifikovány přímým modelováním Lammovy rovnice v programu SEDPHAT (neuvedeno). Experiment potvrdil tvorbu stabilního komplexu přítomných proteinů v poměru 1:1.

Některé studie navrhují, že aktivace c-Jun N-terminální kinasy při oxidativním stresu byla iniciována narušením kovalentní interakce mezi ASK1 cysteinem 250 a cysteinem 32 z katalytického centra TRX1 (Zhang *et al.*, 2004; Nadeau *et al.*, 2009).

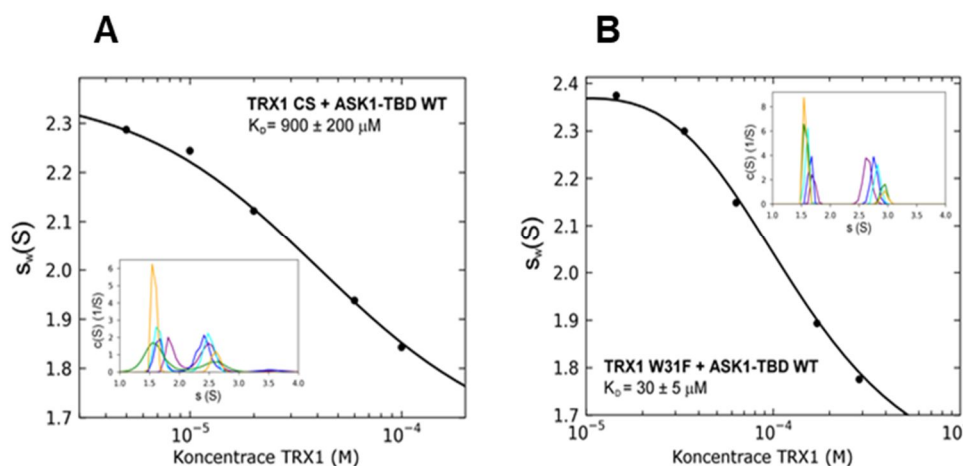
Přestože se zmíněný mechanismus aktivace zdá velmi nepravděpodobný v silně redukujícím prostředí cytosolu, rozhodli jsme se tuto hypotézu ověřit. Experimenty sedimentační analýzy byly rovněž prováděny v silně redukujícím prostředí (2mM nebo 5mM β -ME), ale s předpokladem reverzibilní vazby. Studium tvorby intermolekulárních disulfidů byla provedeno prostřednictvím neredukující SDS-PAGE a její výsledek je uveden na obr. 5.9. Proteiny byly dialyzovány proti pufru bez redukčních činidel a následně analyzovány na SDS-PAGE za redukujících a neredukujících podmínek. Z obr. 5.9 je patrné, že ani po 36 hod dialýzy nebyl pozorován vznik intermolekulárních disulfidů.



Obr. 5.9 15% (w/w) vizualizované gely z neredukující (**A**) a redukující (**B**) SDS-PAGE analýzy ASK1-TBD, TRX1 a komplexu ASK1-TBD:TRX1. Proteiny byly dialyzovány při 4 °C proti pufru obsahujícím 20mM Tris (pH 7.5) a 200mM NaCl. Vzorky byly odebírány před dialýzou, po 12 a 36 hod dialýzy. Komplex byl připraven v poměru 1:1.

Dále byly studovány dvě mutantní verze TRX1, konkrétně TRX1 CS (Cys³² a Cys³⁵ aktivního centra nahrazeny serinem) a TRX1 W31F. Důvodem, proč byl nejprve charakterizován vliv těchto mutací, je jejich lokalizace v aktivním centru TRX1, jehož funkce je klíčová při regulaci proteinů pomocí redoxního mechanismu. Mutace cysteinů v katalytickém motivu ³¹WCGPC³⁵ vede k úplné inhibici interakce s ASK1 (Fujino *et al.*, 2007; Liu, 2002; Saitoh *et al.*, 1998) a oxidace cysteinů ovlivňuje konformaci konzervovaného Trp³¹ (Qin *et al.*, 1996; Weichsel *et al.*, 1996).

Vzhledem k očekávané nižší vazebné afinitě a ke spolehlivému určení K_D těchto komplexů byla koncentrace ASK1-TBD zvýšena na 20 μ M. Koncentrační poměry ASK1-TBD:TRX1 CS byly zvoleny 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 a 1:5. V případě TRX1 W31F byly vybrány koncentrační poměry 4:3, 1:2, 1:4, 1:10 a 1:29. Všechny vazebné izotermy s_w byly získány opět s použitím 1:1 Langmuirova vazebného modelu.

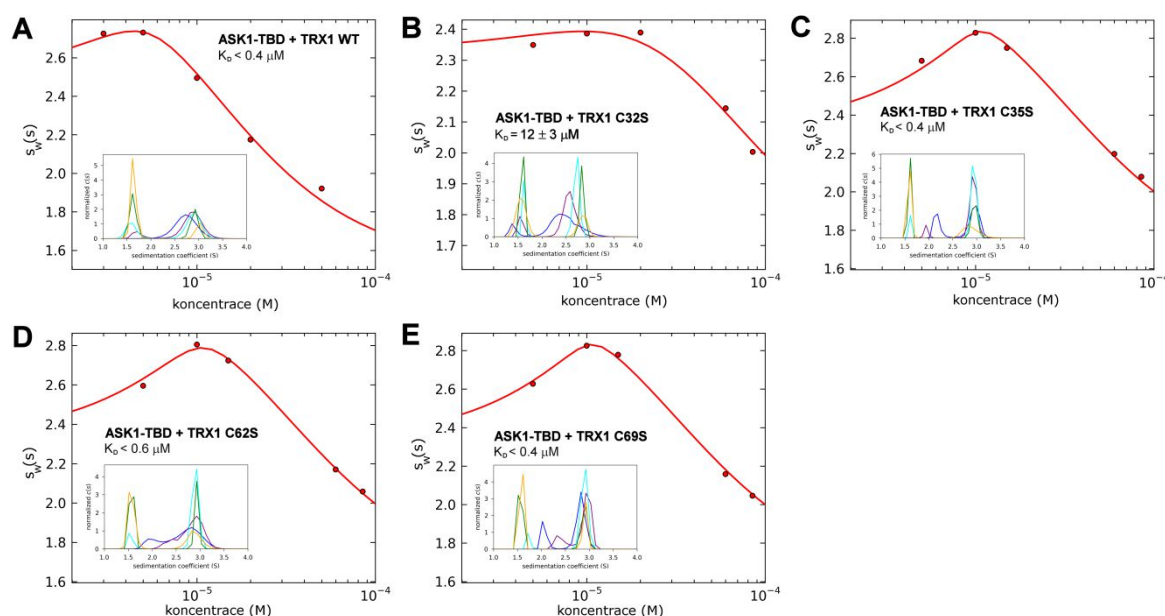


Obr. 5.10 Izotermy vážených průměrů sedimentačních koeficientů získaných ze sedimentační analýzy mutantů TRX1 CS (**A**) a TRX1 W31F (**B**) za redukujících podmínek. **A** – izoterma s_w získaná z měření sedimentační rychlosti směsi ASK1-TBD (20 μ M) a TRX1 CS (5-100 μ M). **B** – izoterma s_w získaná z měření sedimentační rychlosti směsi ASK1-TBD (20 μ M) a TRX1 W31F (15-290 μ M). Vložené obrázky představují kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ za různých podmínek měření (koncentrace a různé molární poměry), jejichž integrací byly získány hodnoty s_w .

Na základě výsledků sedimentační analýzy za redukujících podmínek (viz obr. 5.10) je zřejmé, že prvky katalytického motivu TRX1 (Cys³² a Cys³⁵, Trp³¹) opravdu sehrávají v interakci velmi zásadní roli. Dramatický pokles vazebné afinity u TRX1 CS vůči ASK1-TBD ($K_D \sim 900 \pm 200 \mu$ M, obr. 5.10 A) ukazuje, že cysteiny aktivního centra

jsou nezbytně zapojeny do interakce s ASK1-TBD. V dané souvislosti to znamená, že došlo téměř k úplnému potlačení interakce. Podobně byl pozorován i významný pokles v případě mutantu TRX1 W31F ($K_D \sim 30 \pm 5 \mu\text{M}$, viz obr. 5.10 B, str. 86). Na základě těchto měření je evidentní, že interakce s ASK1 je podmíněna strukturní integritou katalytického motivu $^{31}\text{WCGPC}^{35}$.

V další fázi jsme se zaměřili na detailnější studium ostatních cysteinů thioredoxinu při interakci. V těchto experimentech jsme se vrátili k původnímu TRX1 WT (obsahující cysteiny Cys³², Cys³⁵, Cys⁶², Cys⁶⁹ a Cys⁷³). Z této varianty byly cílenou mutagenézí připraveny další mutantní verze, konkrétně TRX1 C32S, TRX1 C35S, TRX1 C62S a TRX1 C69S. Je známo, že tyto mutace nemají dopad na strukturu TRX1 (Qin *et al.*, 1996; Weichsel *et al.*, 1996).



Obr. 5.11 Izotermy vážených průměrů sedimentačních koeficientů ze série experimentů sedimentační analýzy komplexu ASK1-TBD a TRX1 mutantů za redukujících podmínek. **A** – TRX1 WT **B** – TRX1 C32S **C** – TRX1 C35S **D** – TRX1 C62S **E** – TRX1 C69S. Izoterma s_w (**A**) byla získána z měření sedimentační rychlosti směsi ASK1-TBD ($5 \mu\text{M}$) a TRX1 WT ($3\text{--}50 \mu\text{M}$). Izotermy s_w (**B–E**) byly získány z měření sedimentační rychlosti směsi ASK1-TBD ($5 \mu\text{M}$) a TRX1 WT ($5\text{--}85 \mu\text{M}$). Vložené obrázky představují kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ za různých podmínek měření (koncentrace a různé molární poměry), jejichž integrací byly získány hodnoty s_w .

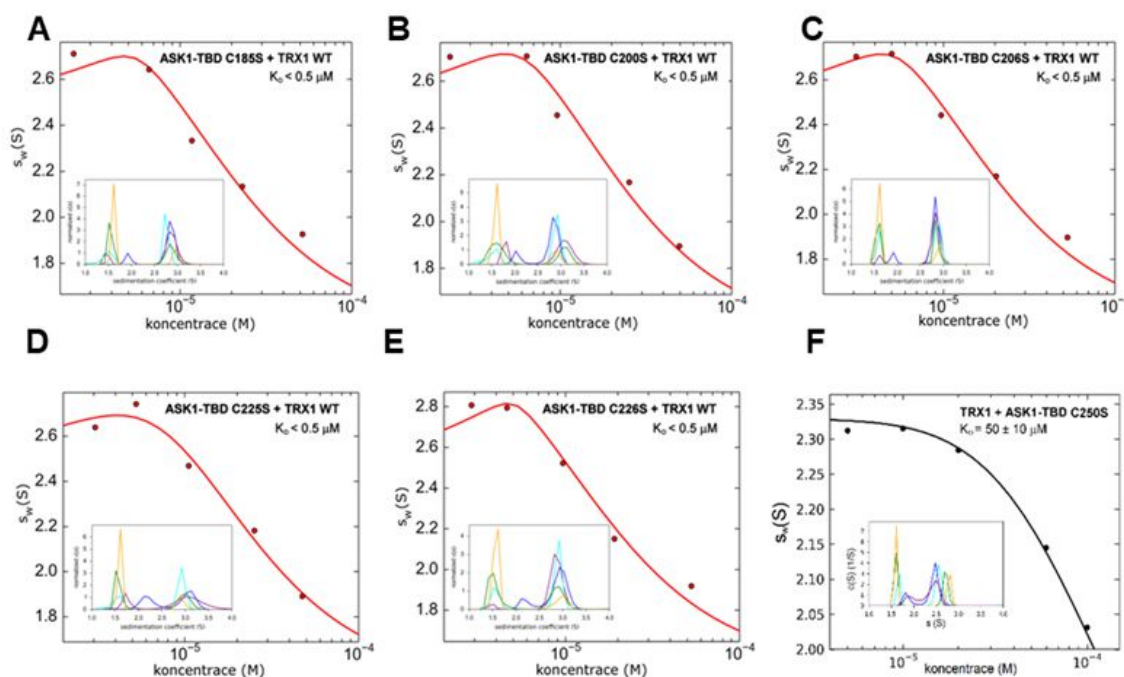
Všechny mutanty byly studovány z hlediska interakční afinity vůči ASK1-TBD pomocí sedimentační analýzy (viz obr. 5.11, str. 87). Koncentrační poměry ASK1-TBD:TRX1 WT byly zvoleny 5:3, 1:1, 1:2, 1:4 a 1:10. V případě ostatních studovaných mutantních variant (obrázky 5.11 B-E) byly vybrány koncentrační poměry ASK1-TBD:TRX1 1:1, 1:2, 1:4, 1:15 a 1:17. Koncentrace ASK1-TBD byla ve všech případech 5 μ M. Všechny vazebné izotermy s_w byly konstruovány rovněž s předpokladem reverzibilního vazebného modelu 1:1.

Z obr. 5.11 A je zřejmé, že mutace C73S, která byla původně zavedena, nijak neovlivnila schopnost interakce s ASK1-TBD (viz obr. 5.11 A, str. 87 a 5.8 B, str. 84). Určené K_D se téměř shodují a menší nuance jsou v souladu s chybou určení při modelování Lammových rovnic v programu SEDPHAT.

Na základě porovnání K_D mezi jednotlivými mutanty je patrné, že pouze mutant C32S váže ASK1-TBD se signifikantně nižší vazebnou afinitou ($K_D \sim 12 \pm 3 \mu$ M). Ostatní mutanty prokázaly srovnatelnou afinitu s WT ($K_D < 0,6 \mu$ M). Cystein 32 z katalytického centra TRX1 se v buňkách nachází ve formě thiolátového anionu, čímž má odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti ve srovnání s Cys³⁵. Vše tedy nasvědčuje tomu, že Cys³² je pro interakci s ASK1-TBD naprosto zásadní.

Na základě předchozího studia cysteinu 250 a jeho potenciální roli při interakci s TRX1 jsme se rovněž rozhodli charakterizovat funkci všech cysteinů ASK1-TBD. Cílenou mutagenézí bylo připraveno celkově sedm cysteinových mutantů, konkrétně ASK1-TBD C120S, C185S, C200S, C206S, C225S, C226S a C250S. Kontrola stability mutantů po zavedení mutace byla provedena pomocí měření DSF (viz tabulka 5.1, str. 90). Tato měření odhalila znatelný pokles teploty denaturace u jediného mutantu, ASK1-TBD C120S. Snížení teploty téměř o 7 °C naznačuje, že tato mutace vedla k destabilizaci terciární struktury této domény. Z tohoto důvodu byl mutant C120S vyloučen z dalších experimentů. Ostatní mutanty byly studovány pomocí sedimentační analýzy analytickou ultracentrifugací. Mutantní varianty C120S, C185S, C200S, C206S, C225S a C226S byly míchány s TRX1 WT v koncentračním poměru ASK1-TBD:TRX1 5:3, 1:1, 1:2, 1:4, 1:10. Koncentrace ASK1-TBD ve směsi byla 5 μ M. Vzhledem k očekávané slabší interakci mutantu ASK1 C250S byla jeho

koncentrace navýšena na 20 μM a proteiny byly míchány v koncentračních poměrech ASK1-TBD:TRX1 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:5.



Obr. 5.12 Izotermy vážených průměrů sedimentačních koeficientů ze série experimentů sedimentační analýzy komplexu TRX1 a ASK1-TBD mutantů za redukujících podmínek. **A** – ASK1-TBD C185S + TRX1 WT **B** – ASK1-TBD C200S + TRX1 WT **C** – ASK1-TBD C206S + TRX1 WT **D** – ASK1-TBD C225S + TRX1 WT **E** – ASK1-TBD C226S + TRX1 WT **F** – ASK1-TBD C250S + TRX1. Izotermy s_w (**A-E**) byly získány z měření sedimentační rychlosti směsi ASK1-TBD (5 μM) a TRX1 WT (3-50 μM). Izoterma s_w (**F**) byla získána z měření sedimentační rychlosti směsi ASK1-TBD (20 μM) a TRX1 (5-100 μM). Vložené obrázky představují původní kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ za různých podmínek měření (koncentrace a různé molární poměry), jejichž integrací byly získány hodnoty s_w .

Tato měření včetně analýzy vazebných izoterem nám poskytly srovnatelnou hodnotu rovnovážné disociační konstanty ($K_D < 0,6 \mu\text{M}$) pro všechny mutanty s výjimkou mutantu C250S (viz obr. 5.12). Mutanty také vázaly TRX1 WT s podobnou afinitou jako ASK1-TBD WT ($K_D < 0,4 \mu\text{M}$, obr. 5.11, str. 87). Vzhledem ke znatelnému poklesu vazebné afinity u ASK1-TBD C250S ($K_D \sim 50 \pm 10 \mu\text{M}$) byl tento mutant studován detailněji v rámci měření časově rozlišeného dohasínání fluorescence (viz kap 5.2.3, str. 92).

Tab. 5.1 Teploty tání (T_m) mutantních forem ASK1-TBD získané pomocí DSF

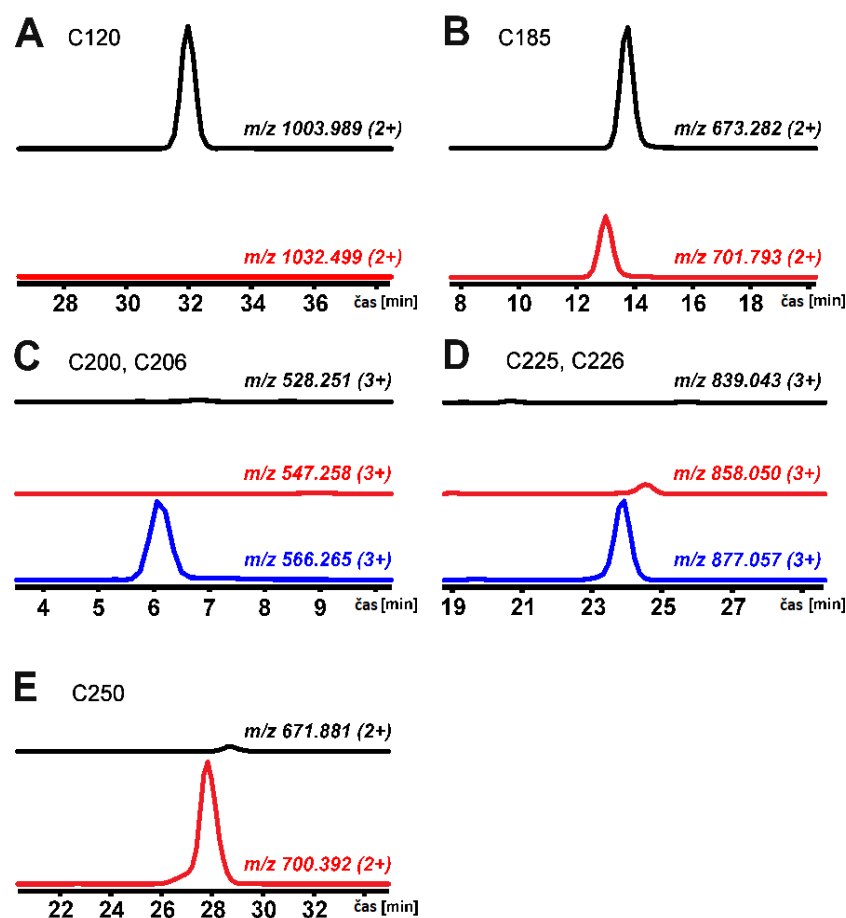
Mutant ASK1	T_m [°C] ^a
WT	49,2 ± 0,8
C120S	42,0 ± 0,1
C185S	47,3 ± 0,3
C200S	50,4 ± 0,3
C206S	49,5 ± 0,9
C225S	48,4 ± 0,1
C226S	47,9 ± 0,2
C250S	49,8 ± 0,1
F175W	49,0 ± 0,2
F242W	52,1 ± 0,1

^astandardní odchylka byla vypočítána ze tří různých experimentů

5.2.2 Alkylace cysteinů spojená s MS detekcí

Experimenty sedimentační analýzy odhalily, že jediná cysteinová mutace ASK1-TBD na pozici 250 má signifikantní dopad na interakci s TRX1 za redukujících podmínek. Přestože ostatní mutantní varianty neprokázaly přímý vliv na interakci, vyvstala zde otázka jejich potenciální role při oxidaci. Rozhodli jsme tedy blíže charakterizovat přístupnost jednotlivých cysteinů na povrchu ASK1-TBD pomocí alkylace spojené s hmotnostní spektrometrií, což mimo jiné pomohlo i k získání dalších strukturních detailů ohledně této domény.

Analýza byla založena na stejném principu jako při měření vodík/deuteriové výměny. Alkylovaný protein za nativních podmínek (viz kap. 4.3.5.3, str. 64) byl štěpen na pepsinové koloně a přímo analyzován prostřednictvím LC-MS/MS. Modifikace cysteinu Cys¹²⁰ nebyla vůbec zaznamenána (viz obr. 5.13 A, str. 91), protože se pravděpodobně nachází uvnitř hydrofóbního jádra, čímž se podílí na stabilizaci terciární struktury. Tuto domněnku podporuje i velmi špatná teplotní stabilita mutantu C120S (viz tab. 5.1, str. 90).



Obr. 5.13 Přístupnost a reaktivita cysteinů ASK1-TBD na základě značení iodoacetamidem a MS detekce. Chromatogramy vybraných peptidů ASK1-TBD, kde byla sledována alkylace cysteinů. Chromatogramy jsou barevně odlišeny v závislosti na stupni modifikace – žádná modifikace (černá), jedna modifikace (červená), dvě modifikace (modrá). Jednotlivé oddíly reprezentují tyto peptidy: **A** – ESEALQSLREA**C**ETVGATL (C120); **B** – Y**C**DTNSDSLQSL (C185); **C** – KEII**C**QKNTM**C**TGN (C200 and C206); **D** – YTFVPYMITPHNKVY**CC**DSSF (C225 and C226); **E** – ELLLGPI**C**L (C250). Odpovídající poměry hmoty/náboj (m/z) daného peptidu jsou uvedeny nad chromatogramy.

Ostatní cysteiny byly modifikovány v různé míře. Cysteiny na pozicích 200, 206 a 250 byly modifikovány téměř kompletně (viz obr. 5.13 C, E). Analýza potvrdila modifikaci C185 pouze ze ~ 40% (viz obr. 5.13 B). Sousední cysteiny Cys²²⁵ a Cys²²⁶ (obr. 5.13 D) byly modifikovány z ~ 80% a ~ 20 % daného peptidu bylo fosforylováno pouze na jednom z těchto cysteinů. Detailní analýza nebyla schopna rozlišit, o který

z dvojice cysteinů se jedná. Z výsledků vyplývá, že cystein na pozici 185 a jeden z cysteinů páru 225 a 226 je pouze částečně přístupný na povrchu ASK1-TBD.

5.2.3 Časově rozlišená fluorescence

Trp³¹ se nachází v katalytickém motivu TRX1 a dosavadní výsledky sedimentační analýzy potvrdily jeho důležitou úlohu při interakci s ASK1-TBD. Vhodnou metodou pro studium lokálních konformačních změn v okolí tohoto tryptofanu byla časově rozlišená fluorescence, kdy bylo možné cíleně detekovat změny v jeho mikrookolí při tvorbě komplexu TRX1 s ASK1-TBD i ASK1-TBD C250S. Nesporná výhoda v tomto případě spočívá i v tom, že jsme se vyhnuli další modifikaci obou proteinů. Měření časově rozlišené fluorescence nám poskytuje informace ohledně dynamiky struktury v blízkosti fluoroforu, flexibility nebo o změnách lokálních interakčních kontaktů s okolním prostředím.

1) ASK1-TBD + TRX1

Oba typy dohasínání byla vyhodnocena s použitím metody maximální entropie (viz kap. 4.3.8, str. 68).

Tab. 5.2 Souhrn měření dohasínání intenzity a anizotropie fluorescence Trp³¹

Vzorek	$\tau_{\text{mean}}^{\text{a,c}}$ (ns)	$\beta_1^{\text{b,d}}$	$\phi_1^{\text{b,e}}$ (ns)	$\beta_2^{\text{b,d}}$	$\phi_2^{\text{b,e}}$ (ns)	$\beta_3^{\text{b,d}}$	$\phi_3^{\text{b,e}}$ (ns)	$\beta_{\text{long}}^{\text{b,d}}$	$\phi_{\text{long}}^{\text{b,e}}$ (ns)
TRX1	1,62	0,018	<0,1	0,069	1,7	-	-	0,133	10
TRX1+ ASK1-TBD WT	3,34	-	-	-	-	0,079	3,3	0,141	30
TRX1+ ASK1-TBD C250S	4,52	0,026	<0,1	0,024	1,3	0,034	3,8	0,136	38

^a Střední doba života excitovaného stavu (τ_{mean}) byla vypočítána podle rovnice 5.

^b Anizotropie fluorescence byla analyzována jako soubor exponenciálních funkcí (rovnice 6), kde amplitudy β_i reprezentují distribuci rotačních korelačních časů ϕ_i .

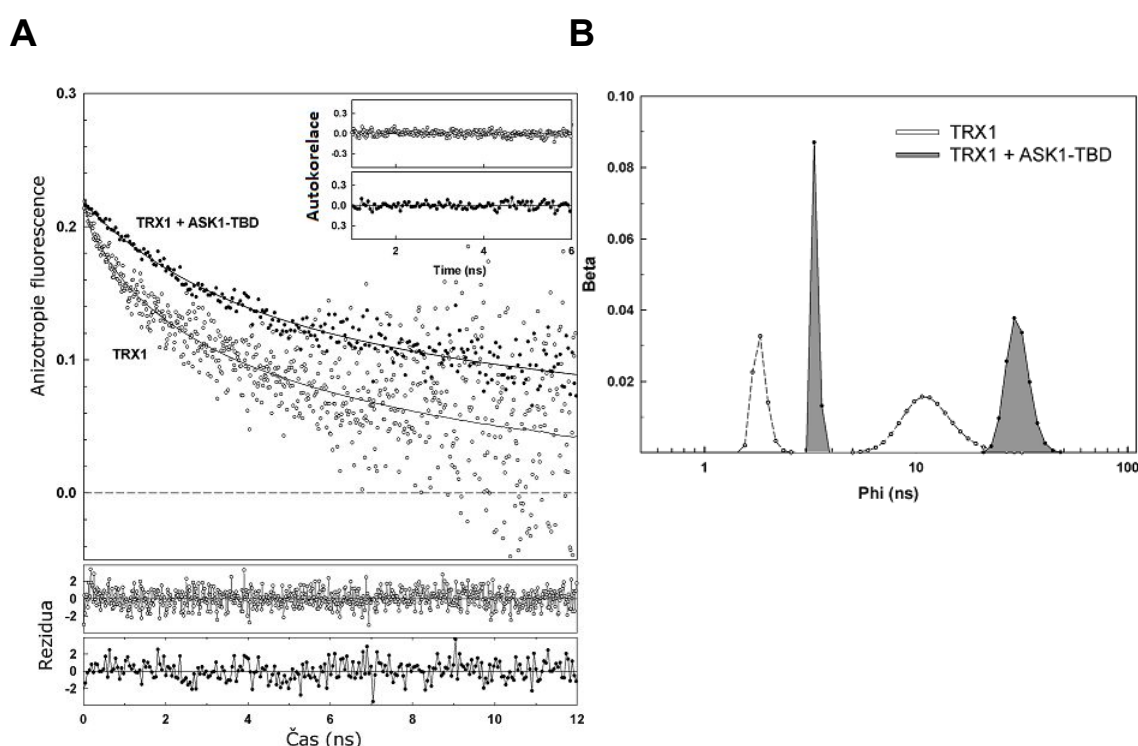
Počáteční anizotropie Trp³¹ pro všechny vzorky byla $r_0 = 0,22 \pm 0,01$. Amplitudy β_1 byly vypočteny z $\beta_1 = r_0 - (\beta_2 + \beta_3 + \beta_{\text{long}})$ pro každý vzorek.

^cSD = 0,05 ns.

^dSD = 0,005

^eSD = 15%

Měření dohasínání intenzity fluorescence poskytlo hodnotu střední doby života excitovaného stavu (τ_{mean}) Trp³¹ samotného TRX1 i v komplexu s ASK1-TBD. Pozorované zvýšení tohoto parametru z 1,62 ns na 3,34 ns (viz tab. 5.2, str. 92) odráží změny v okolí tryptofanu při tvorbě komplexu. Změny mohou být způsobeny např. lokální konformační změnou, která ovlivní interakce Trp³¹ s jeho okolím. Případně mohou poukazovat i na přímou interakci Trp³¹ s ASK1-TBD, čímž dochází k omezení jeho kontaktu s polárním prostředím nebo změně zhášecích interakcí v jeho blízkém okolí. Poměrně malá hodnota τ_{mean} samotného TRX1 je zapříčiněna jeho lokalizací na povrchu proteinu (viz obr. 2.3, str. 22).



Obr. 5.14 Měření časově rozlišeného dohasínání fluorescenční anizotropie Trp³¹. **A** – Dohasínání anizotropie fluorescence pro TRX1 v nepřítomnosti (○) a v přítomnosti (●) ASK1-TBD. Správnost obou vypočítaných křivek dokazuje reziduální funkce uvedena v panelech níže (šedá pro TRX1 a černá pro komplex ASK1-TBD:TRX1). Kvalita výpočtu je dále prokázána souborem autokorelačních funkcí uvedených v pravém horním rohu (šedá pro TRX1 a černá pro complex ASK1:TRX1). **B** – Distribuce rotačních korelačních časů Trp³¹ v nepřítomnosti a přítomnosti ASK1-TBD. Nerozlišitelná komponenta s krátkým korelačním časem ($\phi < 100$ ps) samotného TRX1 není v grafu uvedena.

Dohasínání anizotropie fluorescence Trp³¹ TRX1 v přítomnosti a nepřítomnosti ASK1-TBD (obr. 5.14 A, str. 93) odhalilo signifikantní změny v rotačním pohybu tryptofanu 31. V případě samotného TRX1 můžeme pozorovat mnohem rychlejší pokles depolarizace fluorescence než v komplexu. Pomalejší pokles poukazuje na sníženou segmentální flexibilitu katalytického motivu, v němž se Trp³¹ nachází. Tato pozorování dobře korelují i se zvýšenou hodnotou střední doby života při interakci, kdy omezená mobilita tohoto motivu způsobila, že Trp³¹ se stal méně přístupný polárnímu rozpouštědлу.

Analýza dohasínání anizotropie fluorescence samotného TRX1 poskytla tři druhy rotačních korelačních časů, které odrážejí dynamické pohyby v rámci molekuly na různé úrovni (viz tab. 5.2, str. 92). Velmi krátký korelační čas ϕ_1 (< 100 ps) odpovídá vlastnímu pohybu tryptofanu a druhý krátký korelační čas ϕ_2 (1,7 ns) segmentálním pohybu v okolí tohoto tryptofanu. Třetí korelační čas ϕ_{long} s hodnotou 10 ns odpovídá rotačnímu pohybu celé molekuly (TRX1) a získaná hodnota se blíží hodnotě pro globulární protein s velikostí 13 kDa (Lakowicz, 2006). Tvorba komplexu potlačila možnost pozorovat krátké korelační časy, ale zároveň došlo ke zvýšení korelačního času odpovídajícího segmentálním pohybům z 1,7 ns na 3,3 ns ($\phi_2 \rightarrow \phi_3$) (viz tab. 5.2, str. 92). Suma amplitud krátkých komponent β_{short} ($\beta_{short} = \beta_1 + \beta_2 + \beta_3$) se rovněž snížila, což indikuje větší omezení úhlů pohybu. Všechny tyto výsledky nasvědčují velmi snížené segmentální flexibilitě katalytického motivu s přítomným Trp³¹. Pozorovaná hodnota ϕ_{long} (30 ns) odpovídá teoretické molekulové hmotnosti komplexu (38,6 kDa). Společně s pozorováním poklesu vazebné afinity u tryptofanového mutantu TRX1 W31F (viz obr. 5.10 B, str. 86) se zdá, že tato aminokyselina, exponovaná na povrchu TRX1, přímo interaguje s ASK1-TBD.

2) ASK1-TBD C250S + TRX1

Měření v případě mutantu ASK1-TBD C250S přinesla zajímavá zjištění. Výsledky uvedené v tab. 5.2 (viz str. 92) poukazují na rozdílné hydrodynamické vlastnosti Trp³¹ u TRX1 v komplexu s ASK1-TBD C250S ve srovnání s WT. Analýza dohasínání anizotropie fluorescence poskytla čtyři druhy rotačních korelačních časů - krátký korelační čas ϕ_1 (< 100 ps), dva delší korelační časy odpovídající segmentálním pohybům ϕ_2 (1,3 ns) a ϕ_3 (3,8 ns) a ϕ_{long} (38 ns), jehož velikost poukazuje vznik

komplexu s TRX1. Sedimentační analýza však potvrdila nižší vazebnou afinitu ASK1-TBD C250S k TRX1 ve srovnání s WT. Simultánní pozorování ϕ_1 a ϕ_2 (pro samotný TRX1) a ϕ_3 (TRX1 vázaný v komplexu) rovněž poukazuje na částečnou tvorbu komplexu, kde pouze část TRX1 interaguje s ASK1-TBD C250S. Zajímavé v této souvislosti je zvýšení ϕ_{long} (z 30 ns na 38 ns) i signifikantní nárůst τ_{mean} (z 3,34 ns na 4,52 ns). Na základě těchto pozorování lze odhadovat, že Trp³¹ z TRX1 interaguje s ASK1-TBD C250S odlišným mechanismem, v důsledku rozdílné konformace ASK1-TBD C250S nebo odlišných interakcí na vazebném rozhraní. Vše tedy nasvědčuje tomu, že Cys²⁵⁰ se nachází v blízkosti vazebného povrchu těchto proteinů a je nezbytný pro korektní interakci mezi ASK1-TBD a TRX1.

3) Tryptofanové mutanty ASK1-TBD

Vzhledem k nedostatku strukturních informací ohledně ASK1-TBD domény, byla pomocí fluorescenčních měření rovněž studována její strukturní flexibilita. Cílová mutace fenylalaninů byla provedena v rámci celé sekvence ASK1 domény na pozicích 132, 175, 242 a 272, abychom získali informace o okolí daného tryptofanu a globální pohled na strukturní dynamiku ASK1-TBD.

Tab. 5.3 Souhrn měření dohasínání intenzity a anizotropie fluorescence tryptofanových mutantů ASK1-TBD

ASK1-TBD W mutant	$\tau_{mean}^{a,c}$ (ns)	$\beta_1^{b,d}$	$\phi_1^{b,e}$ (ns)	$\beta_2^{b,d}$	$\phi_2^{b,e}$ (ns)
W132	4,62	0,033	2,7	0,190	18
W175	5,35	0,038	2,0	0,180	18
W242	4,94	0,020	5,0	0,192	18
W272	4,22	0,032	2,5	0,162 0,013	16 aggr. (>50)

^a Střední doba života excitovaného stavu (τ_{mean}) byla vypočítána podle rovnice 5.

^b Anizotropie fluorescence byla analyzována jako soubor exponenciálních funkcí (rovnice 6) kde amplitudy β_i reprezentují distribuci rotačních korelačních časů ϕ_i .

^cSD = 0,05 ns.

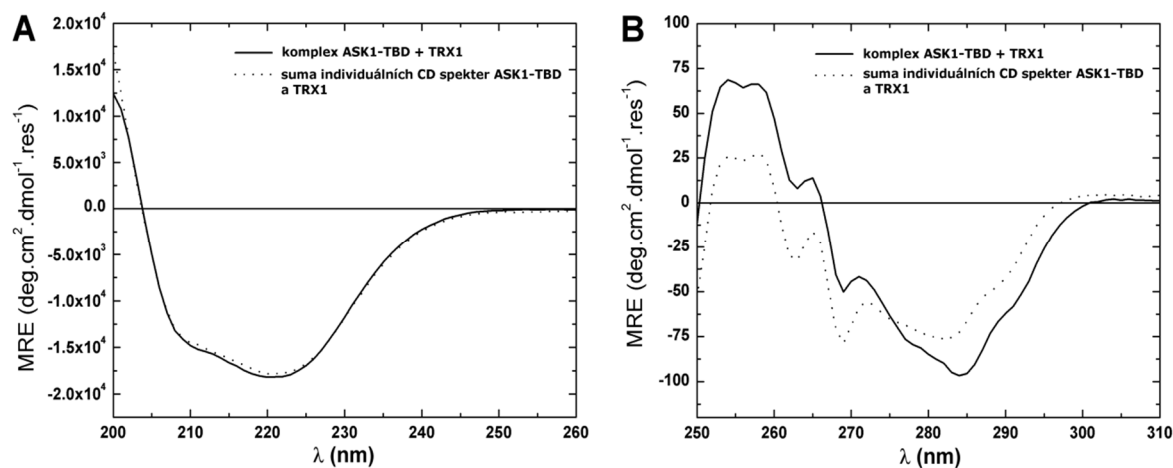
^dSD = 0,005

^eSD = 15%

Výsledky těchto měření jsou uvedeny v tab. 5.3, viz str. 95. U všech mutantů byla pozorována relativně dlouhá střední doba života excitovaného stavu τ_{mean} (v rozmezí 4,22-5,35 ns), což napovídá, že všechny tryptofany se pravděpodobně nachází v hydrofóbních oblastech nepřístupných polárnímu prostředí (Schauerte & Gafni, 1989). Z analýzy dohasínání anizotropie fluorescence byly zjištěny velmi malé amplitudy u nejrychlejšího rotačního a segmentálního pohybu samotného tryptofanu (β_1). Malé amplitudy korelačního času ϕ_1 značí omezený pohyb tryptofanů v těchto pozicích, což znamená, že se nachází v rigidních oblastech. Výsledná data naznačují, že ASK1-TBD je velmi kompaktní a rigidní doména.

5.2.4 CD spektroskopie

Vzhledem k absenci strukturních informací ohledně domény ASK1-TBD nám měření cirkulárního dichroismu poskytlo informace ohledně orientačního zastoupení prvků sekundární struktury. Simultánně bylo provedeno i měření v blízké oblasti UV (250-320 nm), kde je možno pozorovat změny v terciární struktuře při vzniku komplexu.



Obr. 5.15 Měření cirkulárního dichroismu. **A** – Srovnání far-UV CD spektra komplexu ASK1-TBD:TRX1 (plná čára) se součtem individuálních spekter ASK1-TBD a TRX1 (tečkovaná čára) **B** – Srovnání near-UV CD spektra komplexu ASK1-TBD:TRX1 (plná čára) se součtem individuálních spekter ASK1-TBD a TRX1 (tečkovaná čára).

Analýzou spektra samotné ASK1-TBD s pomocí K2D metody (Andrade *et al.*, 1993) bylo zjištěno, že ASK1-TBD obsahuje ~ 35% α -helikální struktury, ~ 20% β -

struktury a ~45% nestrukturovaných oblastí, což je v souladu s teoretickou predikcí sekundární struktury s pomocí on-line nástroje PSIPRED (35% α , 15% β a 50% nestrukturovaných oblastí)(Jones, 1999).

Na obrázku 5.15 A (viz str. 96) je far-UV CD komplexu ASK1-TBD:TRX1 (míchaných ve stechiometrii 1:1), které při srovnání se součtem spekter samotných proteinů nevykazuje žádné změny v sekundární struktuře.

Tvorba komplexu rovněž nevyvolala signifikantní změny v terciární struktuře (viz obr. 5.15 B). Menší difference byly pozorovány pouze v oblasti 275-295 nm, které nejspíše reflektují konformační změnu Trp³¹ při vzniku komplexu. Získané informace jsou tedy plně konzistentní s výsledky z měření časově rozlišené fluorescence. Shrnutím těchto poznatků lze konstatovat, že ASK1-TBD je velmi rigidní doména, u které nedochází k signifikantním konformačním změnám ani při vazbě TRX1.

5.2.5 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS)

Maloúhlový rozptyl rentgenového záření zastává v oblasti strukturní biologie svou nezastupitelnou úlohu. Hlavním důvodem širokého využití této techniky je stále více problémů s krystalizací proteinů především z důvodu jejich konformační flexibility. Přestože jsou výsledkem této analýzy pouze struktury s nízkým rozlišením, může poskytnout cenné informace o tvaru a dynamice molekul v roztoku a konformačních změnách při tvorbě komplexu. Naší hlavní motivací pro použití SAXSu byly nedostačující informace ohledně struktury ASK1-TBD a neúspěšné pokusy o krystalizaci komplexu ASK1-TBD:TRX1.

Tab 5.4 *Strukturní parametry získané ze SAXS*

Vzorek	R_g^a (Å)	R_g^b (Å)	$M_{wl(0)}^c$ (kDa)	D_{max}^d (Å)
ASK1-TBD	23,7 ± 0,3	24,2 ± 0,2	~25	82
ASK1-TBD:TRX1	28,9 ± 0,2	29,3 ± 0,1	~37	99

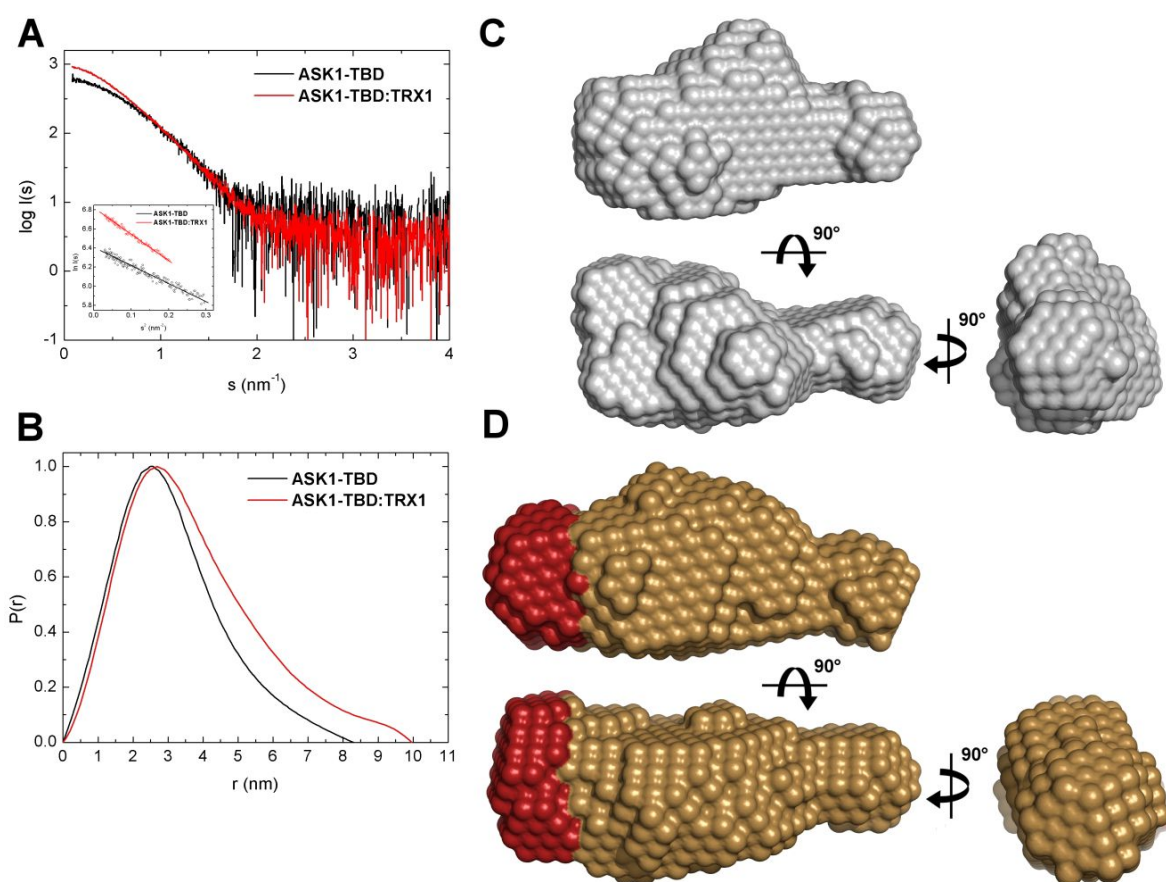
^aZískané z Guinierovy aproximace

^bZískané z $P(r)$ funkce

^cOdhad ze srovnání intenzity rozptylu v přímém směru $I(0)$ s rozptylem referenčního roztoku hovězího sérového albuminu

^dStanovené nepřímou Fourierovou transformací ze získaných SAXS dat

Experimentální SAXS rozptylové křivky jsou uvedené na obrázku 5.16 A. Absenci agregátů ve vzorcích dokazuje linearita Guinierova výnosu, který je součástí vloženého obrázku v 5.16 A. Zdánlivá molekulová hmotnost byla určena ze srovnání intenzity rozptylu v přímém směru $I(0)$ s rozptylem referenčního roztoku hovězího sérového albuminu. Odhadovaná molekulová hmotnost komplexu ASK1-TBD (37 kDa, viz tab 5.4, str. 97) koresponduje s molární stechiometrií komplexu 1:1, určenou již pomocí sedimentační analýzy (teoretická molární hmotnost 38,6 kDa, viz obr. 5.8 A, str. 84).



Obr. 5.16 Strukturní charakterizace komplexu ASK1-TBD a TRX1 za redukujících podmínek pomocí SAXS. **A** – Intenzita rozptylu jako funkce rozptylového vektoru s ($s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, kde 2θ je úhlem rozptylu a λ je vlnová délka záření). Vložené obrázky představují Guinierovy výnosy ASK1-TBD při koncentraci 2,3 mg.ml⁻¹ a komplexu ASK1-TBD:TRX1 při koncentraci 6 mg.ml⁻¹. **B** – distribuční funkce vzdáleností $P(r)$. **C** – průměrná *ab initio* molekulární obálka ASK1-TBD získané z programu DAMMIN. **D** – průměrná *ab initio* molekulární obálka komplexu ASK1-TBD:TRX1 získané z programu DAMMIN. Rozdíl mezi obálkami ASK1-TBD a komplexu je zvýrazněn červenou barvou.

Hodnoty gyračního poloměru R_g byly získány jednak ze směrnice Guinierova výnosu a také přímo z distribuční funkce vzdáleností $P(r)$ (viz tab. 5.4, str. 97). Větší gyrační poloměr komplexu poukazuje na větší asymetrii. Tento předpoklad potvrzuje i distribuční funkce vzdáleností $P(r)$ (viz obr. 5.16 B str. 98), jejíž maximální rozpětí určuje maximální meziatomovou vzdálenost v rámci molekuly D_{max} (viz tab. 5.4). Při tvorbě komplexu došlo k nárustu této vzdálenosti z 82 na 99 Å, potvrzující více protáhlý a asymetrický tvar komplexu ASK1-TBD:TRX1.

Na základě získané distribuční funkce vzdáleností byla konstruována *ab initio* molekulární obálka v programu DAMMIN a DAMAVER pro ASK1-TBD a komplex ASK1-TBD:TRX1, obojí uvedené na obr. 5.16 C a D. Rekonstruované obálky představující průměr nejméně z deseti různých iterací odráží dynamický tvar molekuly v roztoku. Odchylku mezi individuálními obálkami charakterizuje tzv. porovnání prostorové rozdílnosti (z angl. NSD – **N**ormalized **S**patial **D**iscrepancy). Nízké hodnoty NSD odpovídají velmi dobrému překryvu těchto obálek a hodnoty kolem 1 jsou mírou dobré shody (Costenaro *et al.*, 2005). NSD hodnota pro obálky ASK1-TBD byla 0,58 a pro obálky komplexu 0,49, což v obou případech poukazuje na zanedbatelné rozdíly. Z obr. 5.16 C je dále patrné, že ASK1-TBD zaujímá v roztoku kompaktní a mírně asymetrickou konformaci, která se směrem k jedné straně zužuje. Obálka komplexu (viz obr. 5.16 D) kopíruje podobný tvar s protáhlejší objemnější částí. Oblast komplexu vyznačená červenou barvou o velikosti ($\sim 20 \times \sim 35 \times \sim 30$ Å) a daném tvaru dobře odpovídá tvaru a velikosti TRX1. Z dalších experimentů hmotnostní spektrometrie a návrhu finálního *ab initio* modelu komplexu se však nezdá být tato lokace TRX1 příliš pravděpodobná (viz kap. 5.3.5, obr. 5.23, str. 110). Z obou modelů se dá však s jistotou říci, že vazba TRX1 je zprostředkována přes rozsáhlé vazebné rozhraní. Vzhledem k minimálním rozdílům mezi obálkou ASK1-TBD a komplexem se zdá, že vazba TRX1 nevyvolává signifikantní konformační změny ASK1-TBD, což je v souladu i s měřením CD spektroskopie. Přesto nelze vyloučit lokální konformační změny nad rámec rozlišovacích schopností této metody.

5.3 Biofyzikální a strukturní charakterizace interakce mezi ASK1-TBD a TRX1 za oxidujících podmínek

5.3.1 Stanovení volných thiolových skupin proteinu

TRX1 obsahuje ve své struktuře celkem 5 cysteinů: Cys³², Cys³⁵, Cys⁶², Cys⁶⁹ a Cys⁷³. Je známo, že kromě intramolekulární oxidace v katalytickém centru TRX1 (na pozicích Cys³² a Cys³⁵), dochází rovněž k uzavření disulfidického můstku mezi cysteiny Cys⁶² a Cys⁶⁹. Vzhledem ke vzdálenosti těchto cysteinů (18 Å) dochází při tvorbě disulfidické vazby k signifikantnímu narušení struktury TRX1 a ztrátě jeho aktivity (Hashemy & Holmgren, 2008). Na základě biologického významu ASK1-TBD je vcelku zřejmé, že integrita komplexu ASK1-TBD:TRX1 by měla být při oxidativním stresu narušena.

Pro studium efektu oxidace TRX1 na interakci s ASK1-TBD bylo nejprve nutné nalézt podmínky, při nichž dochází k oxidaci na různé úrovni, respektive k tvorbě jednoho či dvou disulfidických můstků. Tab 5.5 shrnuje výsledky spektrofotometrického stanovení počtu volných thiolových skupin proteinů (viz kap. 4.3.1, str. 54) v redukovaném stavu a při jejich oxidaci 5× a 100× molárním nadbytkem H₂O₂ (dále jen 5× H₂O₂, případně 100× H₂O₂). Důvodem pro přesné vymezení oxidačních podmínek bylo vyhnout se tvorbě nepřírozeného oxidačního stresu. Paralelně byly oxidované proteiny studovány pomocí hmotnostní spektrometrie (MS/MS), při které byla identifikována přesná lokalizace disulfidických můstků.

Tab 5.5 Stanovení počtu volných thiolových skupin TRX1 a ASK1-TBD za redukujících a oxidujících podmínek

Protein	Redukovaný	Oxidovaný 5× H ₂ O ₂	Oxidovaný 100× H ₂ O ₂
TRX1 WT	4,9 ± 0,1	3,1 ± 0,4	0,4 ± 0,1
TRX1 C73S	3,8 ± 0,4	2,1 ± 0,4	0,1 ± 0,1
ASK1-TBD	7,1 ± 0,3	4,7 ± 0,2	nestanoveno

Z výsledků je zřejmé, že oxidace peroxidem vodíku za mírných podmínek ($5\times \text{H}_2\text{O}_2$) vyvolala u TRX1 C73S a TRX1 WT pokles volných cysteinů ze 4 na 2 (resp. z 5 na 3), což odpovídá tvorbě jedné disulfidické vazby (Cys³²-Cys³⁵). Při silné oxidaci ($100\times \text{H}_2\text{O}_2$) došlo v obou případech k poklesu na 0, což odpovídá uzavření obou disulfidických můstků, Cys³²-Cys³⁵ a Cys⁶²-Cys⁶⁹. V případě TRX1 WT vzešlo podezření na dimerizaci proteinu skrze Cys⁷³. Z toho důvodu byl oxidovaný TRX1 WT studován detailně pomocí sedimentační analýzy (viz níže).

V další etapě byla studována i oxidace ASK1-TBD, přičemž byly použity stejné koncentrace H_2O_2 , jako v případě TRX1. Pomocí spektrofotometrické metody byl při mírných podmínkách stanoven pokles cysteinů z původních 7 na 5, což odpovídá tvorbě jedné disulfidické vazby. V přítomnosti vyšších koncentrací peroxidu vodíku docházelo k precipitaci ASK1-TBD a proto je nebylo možné použít.

5.3.2 Sedimentační analýza ASK1-TBD a TRX1

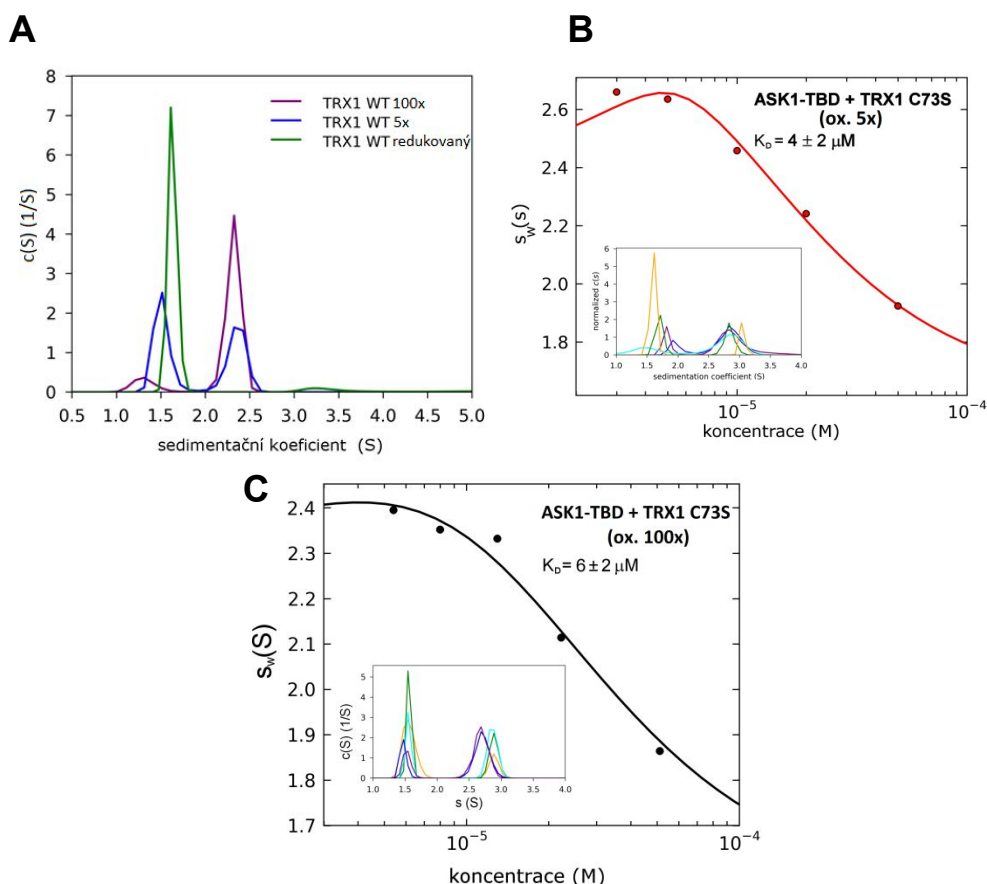
Měření za oxidujících podmínek byla provedena při $48000 \text{ ot.min}^{-1}$ v pufru bez redukčních činidel. V důsledku nízké absorpance obou proteinů byla k analýze použita data získaná interferenční optikou. Proteiny byly oxidovány dle protokolu, uvedeném v kap. 4.3.1. Izotermie vážených průměrů sedimentačních koeficientů (s_w) byly opět získány s využitím modelu reverzibilní vazby se stechiometrií 1:1.

Sedimentační analýza potvrdila naši hypotézu ohledně tvorby homodimerů při oxidaci WT a to i při poměrně nízké koncentraci (10 a $50 \mu\text{M}$). V daném ohledu bylo toto arteficiální chování TRX1 WT nežádoucí a proto byly další experimenty realizovány v přítomnosti mutantní varianty TRX1 C73S (TRX1).

Interakce mezi oxidovaným TRX1 a ASK1-TBD byla studována za podmínek určených pomocí spektrofotometrické analýzy (viz výše). Cílem této studie bylo prokázat, že vlivem oxidace TRX1 nebo ASK1 dochází k poklesu vazebné afinity. V obou případech měření byla ASK1-TBD ($5 \mu\text{M}$) titrována oxidovaným TRX1 v koncentračním poměru ASK1.

Z analýzy vazebné izotermie s_w na obr. 5.17 B (str. 102) vyplývá, že oxidace za mírných podmínek vedoucí k uzavření disulfidické vazby mezi Cys³² a Cys³⁵ má významný dopad na vazebnou afinitu. Nejlepší aproximace poskytla hodnotu $K_D \sim 4 \pm 2 \mu\text{M}$. Analýza vazebné izotermie u silně oxidovaného TRX1 poskytla téměř stejnou

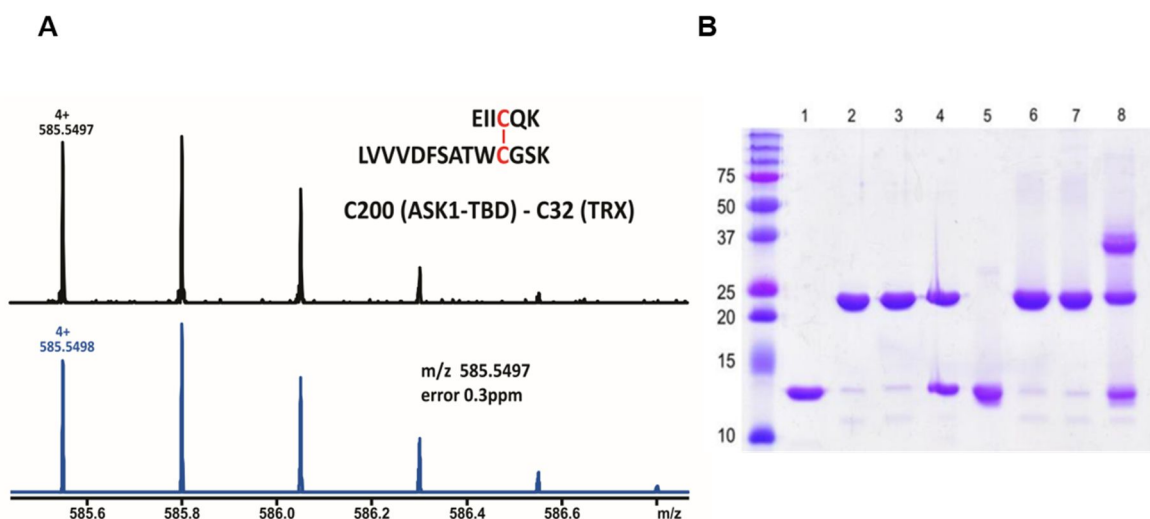
hodnotu K_D ($6 \pm 2 \mu\text{M}$). Zanedbatelný rozdíl mezi afinitou mírně a silně oxidovaného thioredoxinu naznačuje, že uzavření disulfidického můstku v aktivním centru TRX1 mezi cysteiny 32 a 35 je rozhodujícím faktorem při disociaci komplexu ASK1:TBD:TRX1 pod vlivem oxidativního stresu.



Obr. 5.17 Sedimentační analýza za oxidujících podmínek. **A** – Normalizovaná kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro TRX1 WT v redukováném stavu (zelená), po oxidaci 5× molárním nadbytkem H_2O_2 (modrá) a po oxidaci 100× molárním nadbytkem H_2O_2 (fialová) **B** – izoterma s_w získaná z měření sedimentační rychlosti směsi ASK1-TBD ($5 \mu\text{M}$) a TRX1 ($3\text{--}50 \mu\text{M}$) oxidovaného 5× molárním nadbytkem H_2O_2 . **C** – izoterma s_w získaná z měření sedimentační rychlosti směsi ASK1-TBD ($5 \mu\text{M}$) a TRX1 ($3\text{--}50 \mu\text{M}$) oxidovaného 100× molárním nadbytkem H_2O_2 . Vložené obrázky představují původní kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ za různých podmínek měření (koncentrace a různé molární poměry), jejichž integrací byly získány hodnoty s_w .

5.3.3 Alkylace spojené s MS detekcí

Dalším cílem bylo studium vlivu oxidace ASK1-TBD na vazbu TRX1 prostřednictvím sedimentační analýzy. Pro tyto účely jsme nemohli využít katalyticky aktivní TRX1, protože by indukoval zpětnou redukci ASK1-TBD. Proto jsme zvolili jeho mutantní formu TRX1 C35,73S, přičemž vnesené mutace nijak neovlivnily vazebnou afinitu vůči ASK1-TBD (viz obr. 5.11 C, str. 87).



Obr. 5.18 Identifikace kovalentního aduktu mezi TRX1 C35,73S a ASK1-TBD za neredukujících podmínek. **A** – Horní spektrum (černá) zobrazuje izotopickou obálku 4+ nabitého iontu s poměrem m/z 585.54966, což odpovídá kovaletně spojenému peptidu EIIC²⁰⁰QK–LVVVDFSATWC³²GPSK. Spodní spektrum (modrá) zobrazuje teoretické spektrum téhož peptidu, což společně s malou chybou zaručuje jednoznačnou identifikaci daného kovalentního spojení. **B** – 15% (w/w) vizualizovaný gel SDS-PAGE s ASK1-TBD a TRX1 C35,73S. Vzorky ASK1-TBD v dráze 3-7 byly oxidovány dle standardního protokolu. Ostatní vzorky byly v pufru bez redukčních činidel při 4°C po dobu 24 hod. Všechny vzorky byly separovány pomocí SDS-PAGE za redukujících (dráhy 1-4) a neredukujících (dráhy 5-8) podmínek. 1 – TRX1 C35,73S, 2 – ASK1-TBD, 3 – ASK1-TBD oxidovaná, 4 – TRX1 C35,73S + ASK1-TBD (poměr 1:1). Dráhy 5-8 obsahují vzorky ve stejném pořadí jako dráhy 1-4.

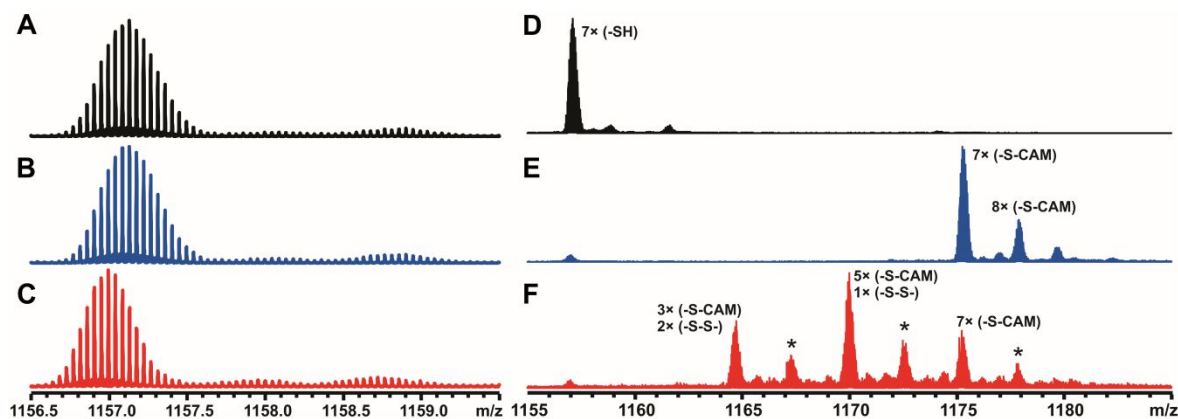
Absence jednoho z cysteinů v katalytickém centru thioredoxinu (Cys³² nebo Cys³⁵) vede ke zvýšené reaktivitě cysteinu druhého. Tento cystein může na bázi nukleofilního ataku reagovat s okolními cysteiny a vytvářet intermolekulární disulfidy. Přístupy založené na kovalentní interakci s TRX1 C35,73S byly aplikovány např. při detekci některých vazebných partnerů thioredoxinu (Balmer *et al.*, 2004).

Z těchto důvodů nemohl být realizován ani náš experiment, protože za oxidujících podmínek docházelo k tvorbě intermolekulárního disulfidického můstku mezi ASK1-TBD a cysteinem 32 z katalytického centra TRX1C35,73S (viz obr. 5.18, str. 103).

Tvorba kovalentního aduktu byla detekována pomocí neredukující SDS-PAGE a LC-MS/MS analýzy (viz obr. 5.18, str. 103). Během inkubace obou proteinů v pufru bez redukčních činidel došlo k jejich kovalentnímu spojení za vzniku aduktu o teoretické velikosti 38,6 kDa (viz dráha 8, obr. 5.18 B). Pomocí MS analýzy byl jako reaktivní cystein ASK1-TBD označen Cys²⁰⁰, což je v souladu se studiem přístupnosti cysteinů na povrchu ASK1-TBD (viz obr. 5.18 A, viz kap 5.2.2, str. 90). Lokalizace toho cysteinu na povrchu ASK1-TBD a tvorba kovalentního aduktu s TRX1 C35,73S dokládá, že je součástí vazebného rozhraní mezi těmito proteiny.

V další fázi byla pomocí alkylace a MS detekce identifikována tvorba intramolekulárních disulfidických můstků v molekule ASK1-TBD. Stanovení volných thiolových skupin v oxidujících podmínkách předpovědělo tvorbu nejméně jedné disulfidické vazby (viz tab 5.5, str. 100). Proto byl oxidovaný stav ASK1-TBD blíže studován pomocí MS za nativních i denaturujících podmínek. Detail ESI-FTMS spektra ASK1-TBD v přítomnosti DTT, bez DTT a po oxidaci je uveden na obr. 5.19 (A-C). Posun izotopické obálky směrem vlevo indikuje tvorbu jednoho až dvou disulfidických můstků (viz obr. 5.19 C, str. 105). Přesnější odhad počtu disulfidických vazeb u oxidované ASK1-TBD byl získán pomocí alkylace cysteinů proteinu iodoacetamidem (viz kap. 4.3.5.3, str. 64). Alkylace byla provedena za denaturujících podmínek v přítomnosti 8M urey a jako kontrola byl použita redukovaná, plně alkylovaná ASK1-TBD (viz obr 5.19 D-F, str. 105). Obr. 5.19 D-F zobrazuje detail izotopické obálky 22⁺ nabitého iontu plně redukované ASK1-TBD (D), plně alkylované ASK1-TBD (E) a oxidované ASK1-TBD s následnou alkylací za nenativních podmínek (F). Spektrum alkylované ASK1-TBD na obr. 5.19 E zobrazuje sedm až osm modifikací, což poukazuje na nespecifickou karbamidomethylaci další aminokyseliny. Ve spektru oxidované ASK1-TBD byly nalezeny dvě série píků (obr. 5.19 F). Intenzivní píky odpovídají ASK1-TBD s třemi, pěti a sedmi karbamidomethylacemi, což naznačuje tvorbu žádného, jednoho či dvou disulfidických můstků. Série méně intenzivních píků

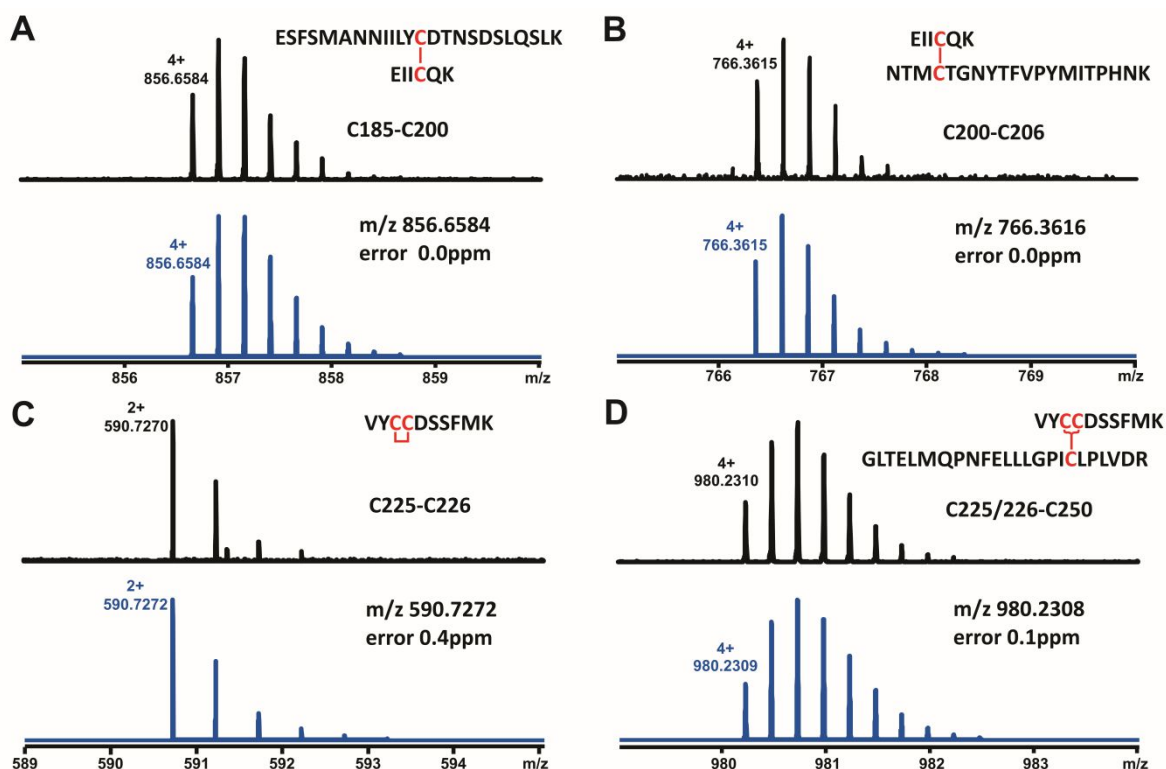
(čtyři, šest a osm modifikací) je ve spektru přítomna v důsledku nespecifické alkylace na dalším reziduu.



Obr. 5. 19 (A-C) Tvorba disulfidických vazeb při oxidaci ASK1-TBD detekována pomocí MS. Detail izotopické obálky 22^+ nabitého ionu intaktní ASK1-TBD v redukováném stavu (A), po odstranění DTT (B) a po oxidaci (C) (dle protokolu viz kap. 4.3.1). Posun izotopické obálky směrem k menším hmotnostem poukazuje na tvorbu jednoho nebo dvou disulfidických můstků (oddíl C). Daný poměr m/z rovněž dokládá, že kromě tvorby disulfidických vazeb nedocházelo k nežádoucí oxidaci postranních řetězců. **(D-F)** Studium tvorby disulfidických vazeb pomocí alkylace intaktního proteinu v denaturujících podmínkách. Detail izotopické obálky 22^+ nabitého ionu intaktní ASK1-TBD v plně redukováném stavu (D), proteinu alkylovaného iodoacetamidem (E), proteinu alkylovaného iodoacetamidem po oxidaci (F). CAM značí zkratku pro karbamidomethylaci. Disulfid je značen -S-S- a volný sulfhydryl -SH. Píky značené hvězdičkou odpovídají karbamidomethylaci ASK1-TBD na N-konci proteinu nebo jiném reziduu než cystein.

Bližší specifikace disulfidických vazeb a míra jejich tvorby byla provedena dvěma přístupy. Oba zahrnovaly štěpení proteasou a následnou LC-MS/MS analýzu. Štěpení trypsinem a MS detekce odhalila různá disulfidová spojení (viz obr. 5.20, str. 106). Z těchto měření vyplývá, že Cys¹²⁰ nebyl v žádném případě zapojen do disulfidické vazby, což je v souladu s jeho lokalizací uvnitř hydrofóbního jádra a tedy nízké pravděpodobnosti jeho oxidace, případně interakce s dalším z přítomných cysteinů (viz obr. 5.13, str. 91). Naopak byly nalezeny intenzivní signály odpovídající

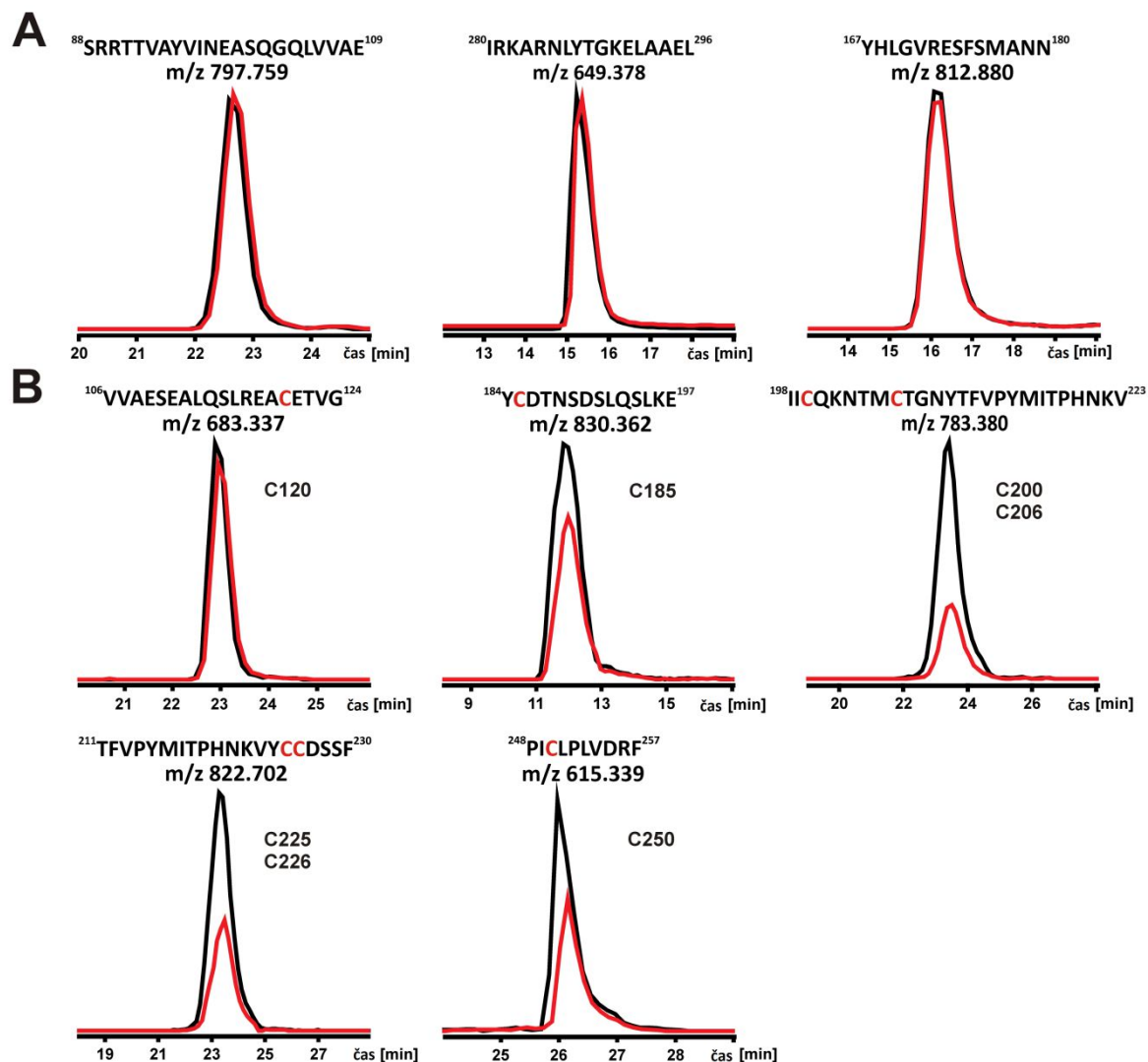
tvorbě vazby Cys²⁰⁰-Cys²⁰⁶ a Cys²²⁵-Cys²²⁶. Současně byly detekovány i slabší signály, které odpovídají disulfidickým vazbám Cys¹⁸⁵-Cys²⁰⁰, Cys²⁵⁰-Cys²²⁵ nebo Cys²⁵⁰-Cys²²⁶.



Obr. 5.20 Identifikace disulfidických vazeb v molekule ASK1-TBD pomocí tryptsinového štěpení a LC-MS/MS analýzy. Detail izotopické obálky pro nalezené peptidy spojené disulfidickými vazbami společně s teoretickým spektrem (modrá). Ve spektrech jsou vyznačeny odpovídající sekvence včetně informace ohledně poměru m/z a a chyby měření.

Štěpení pepsinem pomohlo blíže charakterizovat zastoupení těchto disulfidických vazeb. Nezbytným předpokladem pro přesnou kvantifikaci bylo porovnávat stejná množství plně alkylovaného a oxidovaného vzorku ASK1-TBD. Porovnání intenzity extrahovaných chromatogramů peptidů s vybranými cysteiny je uvedeno na obr. 5.21, str. 107. Z výsledků je zjevné, že cystein Cys¹²⁰ zůstává v roztoku ve formě volného sulfhydrylu i za oxidujících podmínek. Největší pokles intenzity byl pozorován v případě cysteinů Cys²⁰⁰, Cys²⁰⁶, Cys²²⁵ a Cys²²⁶. Mírný pokles byl rovněž zaznamenán pro peptidy obsahující cystein 185 a 250. Vznik dalších disulfidických vazeb v molekule ASK1-TBD s minimální četností a jejich funkční dopad na ASK1-TBD není prozatím jasný (viz obr. 5.21). S jistotou lze říci, že při oxidaci ASK1-TBD dochází k uzavření disulfidických vazeb mezi Cys²⁰⁰-Cys²⁰⁶

a Cys²²⁵-Cys²²⁶, což bylo pozorováno i při štěpení trypsinem. Získaná data jsou plně konzistentní s předchozími výsledky z nativního MS měření intaktního proteinu i alkylace za denaturujících podmínek.



Obr. 5.21 Detekce cysteinů účastnících se disulfidické vazby. Porovnání extrahovaných chromatogramů pro plně alkylovanou ASK1-TBD (černá) pro ASK1-TBD alkylovanou po oxidaci (červená). **A** – Analýzu stejného množství vzorku v obou případech dokazuje identická intenzita chromatografických píků pro peptidy bez cysteinů. **B** – Snížení intenzity chromatografického píku značí zapojení daného cysteinu do disulfidické vazby. Každý chromatogram obsahuje sekvenci peptidu s odpovídajícím poměrem m/z a číslo cysteinu dle jeho pořadí v sekvenci ASK1-TBD.

5.3.4 Časově rozlišená fluorescence

Časově rozlišená fluorescence tryptofanů v rámci ASK1-TBD nám poskytla informace ohledně flexibility této domény. Strukturní model ASK1-TBD (viz obr. 5.23, str. 110) napovídá, že fenylalaniny na pozicích Phe¹⁷⁵ a Phe²⁴² (tryptofanové mutanty F175W a F242W, viz kap. 5.2.3, str. 94) se vyskytují v blízkosti cysteinů účastnících se tvorby disulfidické vazby při oxidaci (Cys²⁰⁰-Cys²⁰⁶ a Cys²²⁵-Cys²²⁶). Z toho důvodu bylo příhodné tyto mutantní varianty použít pro měření časově rozlišené fluorescence za oxidujících podmínek a studovat tak potenciální strukturní změny v těchto oblastech. Výsledky měření DSF (viz tab. 5.1, str. 90) dokazují, že ani tyto mutace neměly destabilizující vliv na strukturu ASK1-TBD. Měření časově rozlišené fluorescence bylo paralelně provedeno pro redukovaný protein a protein oxidovaný za mírných podmínek (5× H₂O₂, viz kap. 4.3.1, str. 54). U oxidovaného mutantu F242W byl zaznamenán signifikantní pokles střední doby života excitovaného stavu τ_{mean} z 4,88 ns (redukovaná forma) na 4,66 ns (oxidovaná forma). Z distribuce dob života excitovaného stavu na obr. 5.22 je patrné, že finální pokles byl pozorován v důsledku zkrácení tří nejdelších komponent doby života, které přispívají k celkové intenzitě fluorescence z 97%. Snížení τ_{mean} poukazuje na zvýšení polarizace nebo změnu zhasívacích interakcí v okolí tryptofanu Trp²⁴². Naopak u mutantu F175W nebyla pozorována změna τ_{mean} (tab. 5.6).

Tab 5.6 Souhrn měření dohasínání intenzity a anizotropie fluorescence tryptofanových mutantů ASK1-TBD

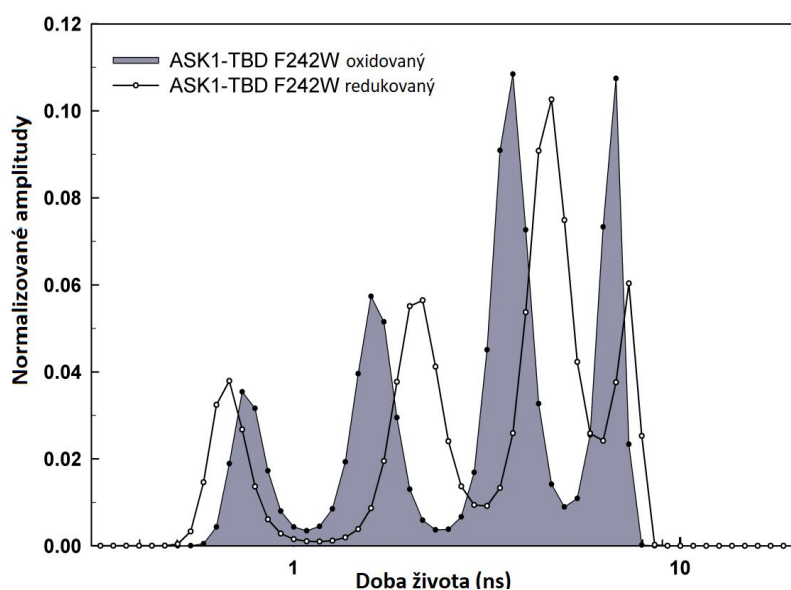
Vzorek		τ_{mean}^a , ns	ϕ_1 , ns	β_1^b	ϕ_2 , ns	β_2
ASK1-TBD F175W	Redukovaný	5,46 ± 0,02	1,2	0,027	15,0	0,21
	Oxidovaný	5,44 ± 0,02	1,1	0,033	15,5	0,20
ASK1-TBD F242W	Redukovaný	4,88 ± 0,02	1,2	0,003	14,5	0,23
	Oxidovaný	4,66 ± 0,05	0,4	0,014	14,0	0,22

^a Střední doba života excitovaného stavu (τ_{mean}) byla vypočítána podle rovnice 5.

^b Anizotropie fluorescence byla analyzována jako soubor exponenciálních funkcí (rovnice 6), kde amplitudy β_i reprezentují distribuci rotačních korelačních časů ϕ_i .

Analýza dohasínání emisní anizotropie fluorescence poskytla dva korelační časy, jeden krátký ($\phi_1 = 0,4\text{--}1,2$ ns) a druhý čas $\phi_2 \sim 15$ ns. Zatímco první korelační

čas odpovídá rychlým segmentálním pohybům v okolí daného tryptofanu, druhý čas odpovídá rotaci globulárního proteinu o velikosti 30 kDa, tedy celkovému rotačnímu pohybu ASK1-TBD (Lakowicz, 2006). U mutantní varianty F175W nebyla pozorována změna rychlého korelačního času, ale u F242W došlo k jeho významnému poklesu z 1,2 ns na 0,4 ns (viz tab. 5.6, str. 108). Oxidace ASK1-TBD významně ovlivnila flexibilitu původně velmi rigidní oblasti v okolí Trp²⁴², protože došlo k výraznému navýšení amplitudy β_1 (0,003 ns \rightarrow 0,014 ns).



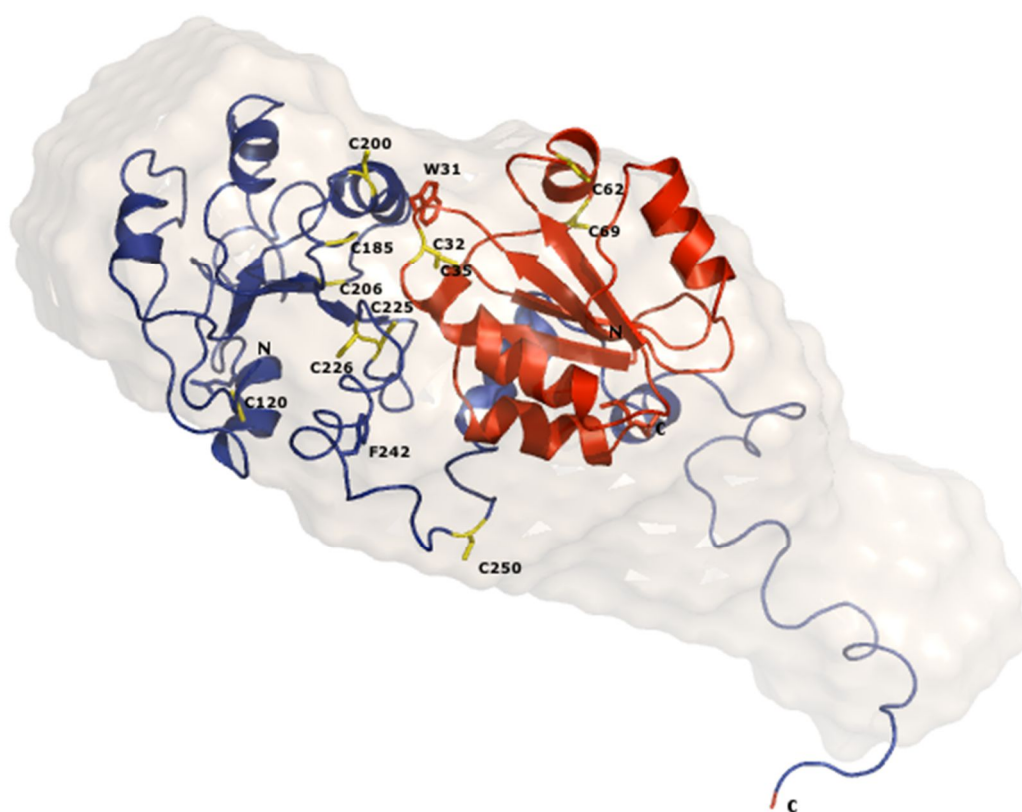
Obr. 5.22 Distribuce dob života excitovaného stavu ASK1-TBD F242W v redukovaném a oxidovaném stavu. Tři nejdelší komponenty doby života excitovaného stavu se zkracují pod vlivem oxidace. V důsledku tohoto trendu byla celková střední doba života excitovaného stavu W242 snížena.

Výsledky z časově rozlišené fluorescence naznačují, že oxidativní stres indukuje strukturní změny v C-koncové oblasti ASK1-TBD v okolí fenylalaninu 242, nejspíše v důsledku uzavření disulfidické vazby mezi Cys²²⁵ a Cys²²⁶.

5.3.5 Strukturní modelování komplexu ASK1-TBD:TRX1

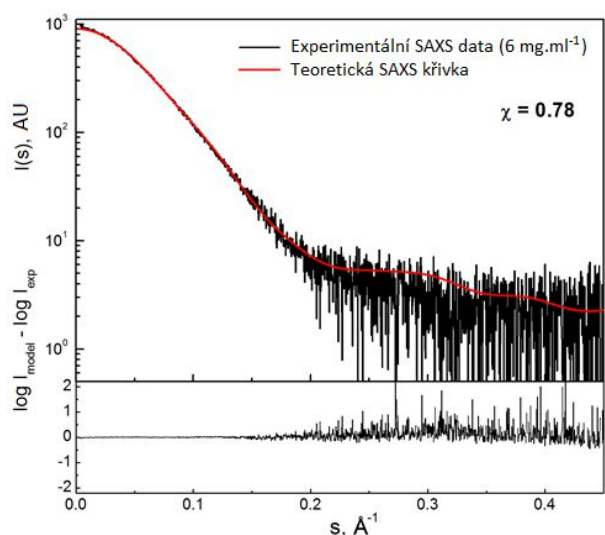
K interpretaci získaných strukturních dat ohledně domény ASK1-TBD a jejího interakčního rozhraní s TRX1 byl navržen *ab initio* model komplexu ASK1-TBD:TRX1. Princip *de novo* modelování je založený na využití veškerých dostupných strukturních

informací. V tomto případě se jednalo o data z měření CD spektroskopie, měření tryptofanové fluorescence i hmotnostně-spektrometrickou analýzu. Proteinové dokování bylo provedeno v programu FRODOCK (Garzon *et al.*, 2009), kde výchozí strukturou receptoru byl teoretický model ASK1-TBD (viz obr. 5.25, str. 111) a ligandem krystalová struktura TRX1 (Weichsel *et al.*, 1996). Strukturní model, který byl konzistentní se získanými SAXS daty (viz 5.2.5, str. 97) byl vygenerován prostřednictvím programu AllosMod-FoXS. Superpozice modelu se SAXS molekulární obálkou komplexu, do které je vložena krystalová struktura TRX1, je uvedena na obr. 5.23.

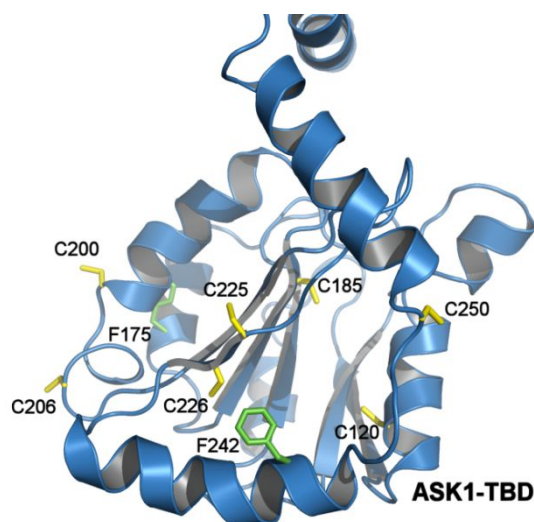


Obr. 5.23 Superpozice modelu komplexu ASK1-TBD: TRX1 získaného programem AllosMod-FoXS s experimentální SAXS obálkou (při koncentraci 6 mg.ml⁻¹). Startovní model pro následnou simulaci byl získán v programu FRODOCK.

Navržený model dobře odpovídá experimentálním datům, kdy klíčové aminokyselinové zbytky, důležité pro regulaci a interakci obou proteinů, jsou součástí vazebného povrchu (TRX1: Cys³², Trp³¹; ASK1-TBD: Cys²⁰⁰, Cys²²⁵, Cys²²⁶, Cys²⁵⁰).



Obr. 5.24 Porovnání vypočítané rozptylové křivky pro teoretický model komplexu ASK1-TBD1:TRX1 s experimentálními SAXS daty komplexu při koncentraci 6 mg.ml⁻¹. Teoretická rozptylová křivka byla získána pomocí programu FOXS.



Obr. 5.25 Detail teoretického modelu ASK1-TBD (sekvence 88-302). Cysteiny jsou vyznačeny žlutě. Důležité fenylalaniny Phe¹⁷⁵ a Phe²⁴², které byly nahrazeny tryptofany pro měření časově rozlišené fluorescence, jsou vyznačeny zeleně.

Teoretický model ASK1-TBD je také v souladu s přístupností cysteinů na povrchu proteinu i lokalizaci fenylalaninu Phe²⁴², který byl indikátorem okolní strukturní změny při oxidaci ASK1-TBD (viz obr. 5.25).

Významná shoda mezi teoretickou rozptylovou křivkou modelu a experimentálními daty je uvedena obr. 5.24, str. 111

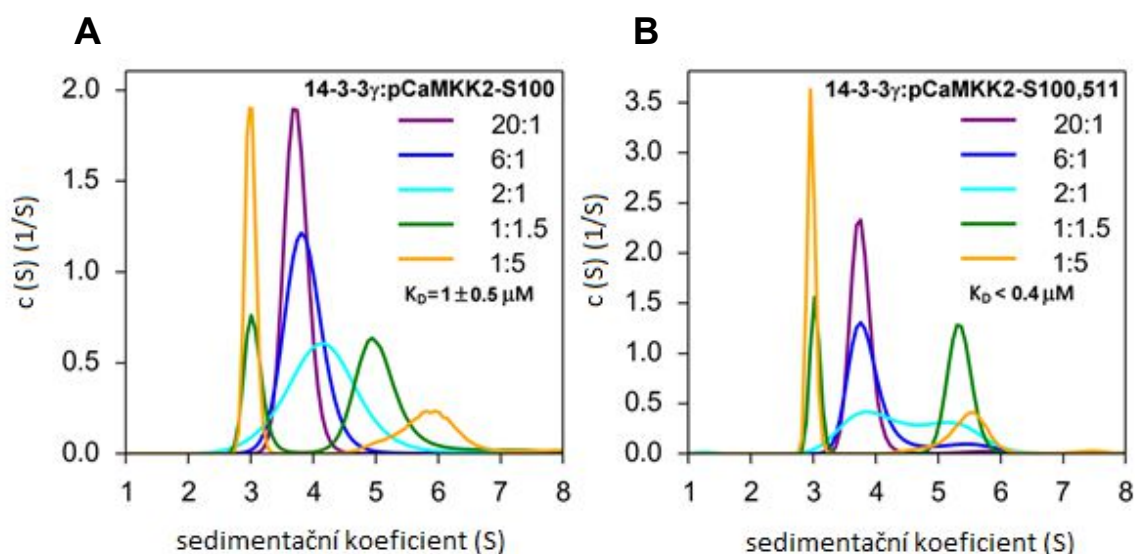
5.4 Biofyzikální a strukturní charakterizace komplexu pCaMKK2:14-3-3 γ

5.4.1 Sedimentační analýza pCaMKK2 a 14-3-3 γ

Prvotní charakterizace vzájemné interakce mezi pCaMKK2 a 14-3-3 γ zahrnovala provedení nativní elektrofórez, které potvrdilo tvorbu komplexu (výsledek neuveden). Bližší analýza pomocí analytické ultracentrifugace poskytla informaci o vazebné stechiometrii a stabilitě komplexu na základě získané hodnoty K_D . V rámci této studie byly provedeny experimenty s CaMKK2 S100 i CaMKK2 S100, 511 (viz str. 76).

MS analýza potvrdila pouze částečnou fosforylaci C-koncového motivu se serinem 511 (přibližně z 50 %, výsledek neuveden), Tento fenomén byl již dříve pozorován. Skupina Schumacher et al. navrhla, že serin 511 je pravděpodobně fosforylován kinasou DAPK1 (Schumacher *et al.*, 2004). Přestože jsme se striktně drželi uvedeného postupu *in vitro* fosforylace, nedokázali jsme docílit stejného efektu a MS analýza ukázala, že fosforylace tohoto místa byla prakticky nulová. Z toho vyplývá, že experimenty provedené s mutantní verzi CaMKK2 S100,511 ve skutečnosti obsahovaly směs dvou fosforylovaných forem³. Vzhledem k malé míře fosforylace serinu 511 *in vivo* lze tedy jen polemizovat o jeho fyziologické relevanci při interakci se 14-3-3 γ .

³ Forma obsahující motiv s fosforylovaným serinem 100 (pSer¹⁰⁰) a druhá forma fosforylovaná na obou vazebných motivech pSer¹⁰⁰+pSer⁵¹¹



Obr. 5.26 Biofizikální charakterizace interakce mezi pCaMKK2 a 14-3-3γ metodou sedimentačních rychlostí. **A, B** – Normalizované kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro směsi pCaMKK2 a 14-3-3γ při různých molárních poměrech. Na základě těchto distribucí byla pomocí globálního modelování Lammovy rovnice získána hodnota zdánlivé rovnovážné disociační konstanty K_D . 14-3-3γ (6 μM) byla titrována pCaMKK2 v rozmezí koncentrací 0,3–30 μM.

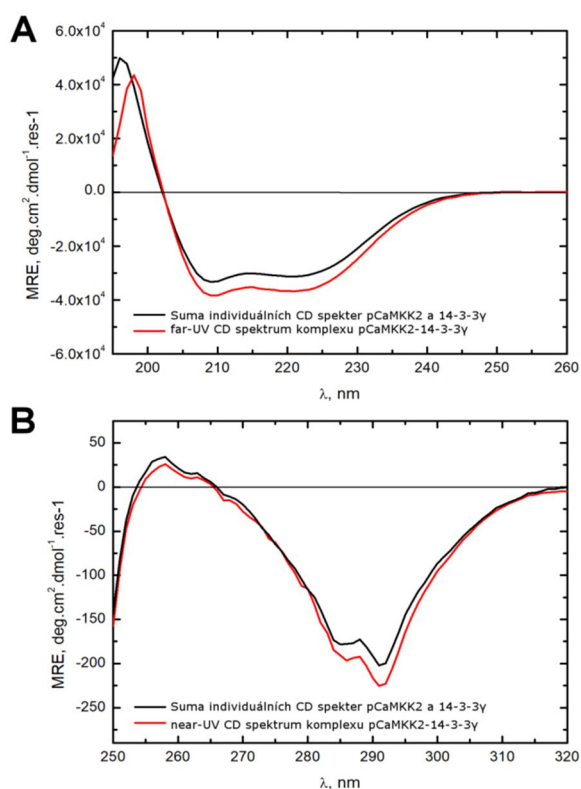
Na obr. 5.26 jsou uvedené normalizované kontinuální distribuce sedimentačních koeficientů $c(s)$ pro směsi pCaMKK2 a 14-3-3γ v různém koncentračním poměru. Z analýzy byly rovněž identifikovány vážené průměry sedimentačních koeficientů $s_{w(20,w)}$ komplexu i samotných proteinů. Sedimentační koeficient komplexu pCaMKK2 S100:14-3-3γ dosáhl hodnoty 6,17 S a poměr frikčního koeficientu f/f_0^4 byl 1,3 (viz obr. 5.26 A). Píky samotných proteinů byly nalezeny při hodnotách 3,91 (pCaMKK2 S100) a 3,16 (14-3-3γ). Pozorovaná hodnota $s_{w(20,w)}$ komplexu pCaMKK2 S100:14-3-3γ odpovídá molekulové hmotnosti ~110 kDa, což poukazuje na vazebnou stechiometrii 1:2 (teoretická molekulová hmotnost 105 kDa). Přímé modelování prostřednictvím Lammovy rovnice s předpokladem reverzibilní vazby a stechiometrie 1:2 (CaMKK2:14-3-3γ) odhalilo hodnotu zdánlivé rovnovážné disociační konstanty $K_D \sim 1 \pm 0,5 \mu\text{M}$.

⁴ Poměr f/f_0 charakterizuje míru asymetrie molekuly neboli její odchýlení od sférického tvaru

Analogicky se postupovalo i při analýze komplexu pCaMKK2 S100,511:14-3-3 γ . V daném případě byla hodnota sedimentačního komplexu stanovena na 5,72 S (viz obr. 5.26 B, str. 113) a poměr f/f_0 na 1,4. Hodnota $s_{w(20,w)}$ odpovídá molekulové hmotnosti ~ 111 kDa, což opět dokládá vazebnou stechiometrii komplexu pCaMKK2: 14-3-3 γ v poměru 1:2. Přímé modelování sedimentačních dat pomocí Lammovy rovnice poskytlo hodnotu $K_D \sim 0,4 \mu\text{M}$. Znatelné zvýšení vazebné afinity naznačuje, že fosforylovaný C-koncový motiv CaMKK2 se účastní vazby se 14-3-3 γ a přispívá tak ke stabilitě komplexu.

5.4.2 CD spektroskopie

Měření cirkulárního dichroismu v blízké i vzdálené oblasti nás mohou informovat o změnách v terciární nebo sekundární struktuře při vzniku komplexu.



Obr. 5.27 Měření cirkulárního dichroismu. **A** – Srovnání far-UV CD spektra komplexu pCaMKK2 S100-14-3-3 γ (červená čára) se součtem individuálních spekter pCaMKK2 S100 a 14-3-3 γ (černá čára). **B** – Srovnání near-UV CD spektra komplexu CaMKK2-14-3-3 γ (červená čára) se součtem individuálních spekter pCaMKK2 a 14-3-3 γ (černá čára). Komplex pCaMKK2: 14-3-3 γ byl míchán ve stechiometrii 1:2.

Abychom zaručili homogenitu vzorku, byla pro měření použita mutantní varianta CaMKK2 S100. Z obr. 5.27 (viz str. 114) je patrné, že vazba 14-3-3 γ na pCaMKK2 S100 nevyvolala významné změny v sekundární nebo terciární struktuře proteinů.

5.4.3 SAXS

Veškeré dosavadní pokusy o krystalizaci komplexu mezi pCaMKK2 a 14-3-3 γ se prozatím jeví jako neúspěšné patrně z důvodu strukturní flexibility. Jednu z možných alternativ k strukturní charakterizaci interakce mezi CaMKK2 a 14-3-3 představuje SAXS. Rozptylová data byla změřena pro samotnou pCaMKK S100, pCaMKK2 S100,511, 14-3-3 $\gamma\Delta C^5$ a odpovídající komplexy v určeném stechiometrickém poměru (1:2, viz kap. 5.4.1, str. 112) při různých koncentracích (viz tab. 5.7, str. 116). Stabilitu komplexů a minimální výskyt agregace ve vzorcích dokazuje jednak linearita Guinierova výnosu, tak i nezávislost hodnot intenzity rozptylu v přímém směru $I(0)$, Porodova objemu V_p a gyračního poloměru R_g na koncentraci vzorků (viz tab. 5.7 a obr. 5.28, str. 116-117). Zdánlivá molekulová hmotnost ~ 47 kDa pro pCaMKK2 a ~ 54 kDa pro 14-3-3 $\gamma\Delta C$ získaná z rozptylu v přímém směru souhlasí s teoreticky vypočtenou molekulovou hmotností (48,0 a 54,3 kDa). Molekulové hmotnosti komplexů pCaMKK2 S100:14-3-3 $\gamma\Delta C$ (92-95 kDa) a pCaMKK2 S100,511:14-3-3 $\gamma\Delta C$ (94-97 kDa) včetně hodnoty V_p (~ 160 nm³) dobře odpovídají stechiometrii 1:2 (teoretická molekulová hmotnost $M_w \sim 102,3$ kDa). Na obr. 5.28 C (viz str. 117) je možno vidět porovnání distribučních funkcí vzdáleností $P(r)$ pro 14-3-3 $\gamma\Delta C$, CaMKK2 samotnou a obou komplexů. Křivky pro CaMKK2 (černá křivka) samotnou a v obou komplexech (modrá a zelená křivka) vykazují značnou asymetrii a větší maximální vzdálenost v rámci molekuly (D_{max}) v porovnání s dimerem 14-3-3 $\gamma\Delta C$ (červená křivka). Toto naznačuje, že pCaMKK2 i molekuly komplexu jsou v roztoku méně kompaktní. Na základě výpočtu $R_g \sim 3N^{1/3}$ (kde N představuje počet reziduí; $D_{max} \sim 2.6R_g$) jsou hodnoty R_g a D_{max} (tab. 5.7) signifikantně větší než odpovídající hodnoty pro sférické proteiny složené ze stejného počtu reziduí (430 pro CaMKK2, 944 pro komplex pCaMKK2 :14-3-3 $\gamma\Delta C$)

⁵ 14-3-3 ΔC : úsek sekvence 1-234, bez flexibilního konce - stabilizační efekt na interakci ligandů se 14-3-3

(Petoukhov *et al.*, 2012b). Nižší hodnoty R_g a D_{\max} pro komplex pCaMKK2 S100,511:14-3-3 γ ΔC ve srovnání s komplexem pCaMKK2 S100:14-3-3 γ ΔC naznačují, že v případě fosforylace obou motivů (pSer¹⁰⁰+pSer⁵¹¹) se vytváří kompaktnější struktura. Nicméně je nutné mít na paměti, že Ser⁵¹¹ byl fosforylovaný pouze částečně a proto se ve skutečnosti jedná o hodnoty pro směs obou komplexů. Proto byla pro následné strukturní modelování použita data komplexu s mutantní variantou CaMKK2 S100.

14-3-3 vazebná místa se často nachází v úsecích neuspořádané struktury (Bustos, 2012) a ani CaMKK2 v tomto ohledu není výjimkou. Z analýzy predikce míry neuspořádanosti v programu PRDOS vyplývá, že N-terminální (1-155) a C-terminální konec (495-588) obklopující kinasovou doménu je pravděpodobně nestrukturovaný (Ishida & Kinoshita, 2007).

Tab. 5.7 Strukturní parametry získané ze SAXS

	c (mg.ml ⁻¹)	R_g (Å) ^b	R_g (Å) ^c	D_{\max} (Å)	V_p^d (nm ³)	$M_w^{e,g}$ (kDa)	$M_w^{f,g}$ (kDa)
14-3-3γΔC^a	3,0	28,7 ± 0,4	28,6 ± 0,4	89	77,8	54 ± 1	49
	1,5	29,0 ± 0,4	29,0 ± 0,4	89	82,8	55 ± 1	52
CaMKK2	2,8	32,6 ± 0,3	32,7 ± 0,3	126	95,6	48 ± 1	60
	2,1	32,1 ± 0,3	32,2 ± 0,3	125	94,0	46 ± 1	59
Komplex	16,9	42,3 ± 0,6	42,4 ± 0,6	146	160,4	92 ± 1	100
pSer¹⁰⁰	12,6	42,5 ± 0,6	42,6 ± 0,6	144	163,4	95 ± 1	102
	9,9	42,4 ± 0,6	42,5 ± 0,6	146	161,1	94 ± 1	101
Komplex	11,9	39,9 ± 0,7	40,0 ± 0,7	141	164,8	97 ± 1	103
pSer^{100,511}	6,5	39,1 ± 0,6	39,2 ± 0,6	141	159,6	94 ± 1	100

^a14-3-3 γ bez posledních 13 reziduí na C-konci

^bVypočítáno pomocí Guinierovy aproximace

^cVypočítáno pomocí programu GNOM.

^dVyloučený objem hydratované částice (Porodův objem).

^eMolekulová váha získána ze srovnání intenzity rozptylu v přímém směru $I(0)$ s rozptylem referenčního roztoku hovězího sérového albuminu

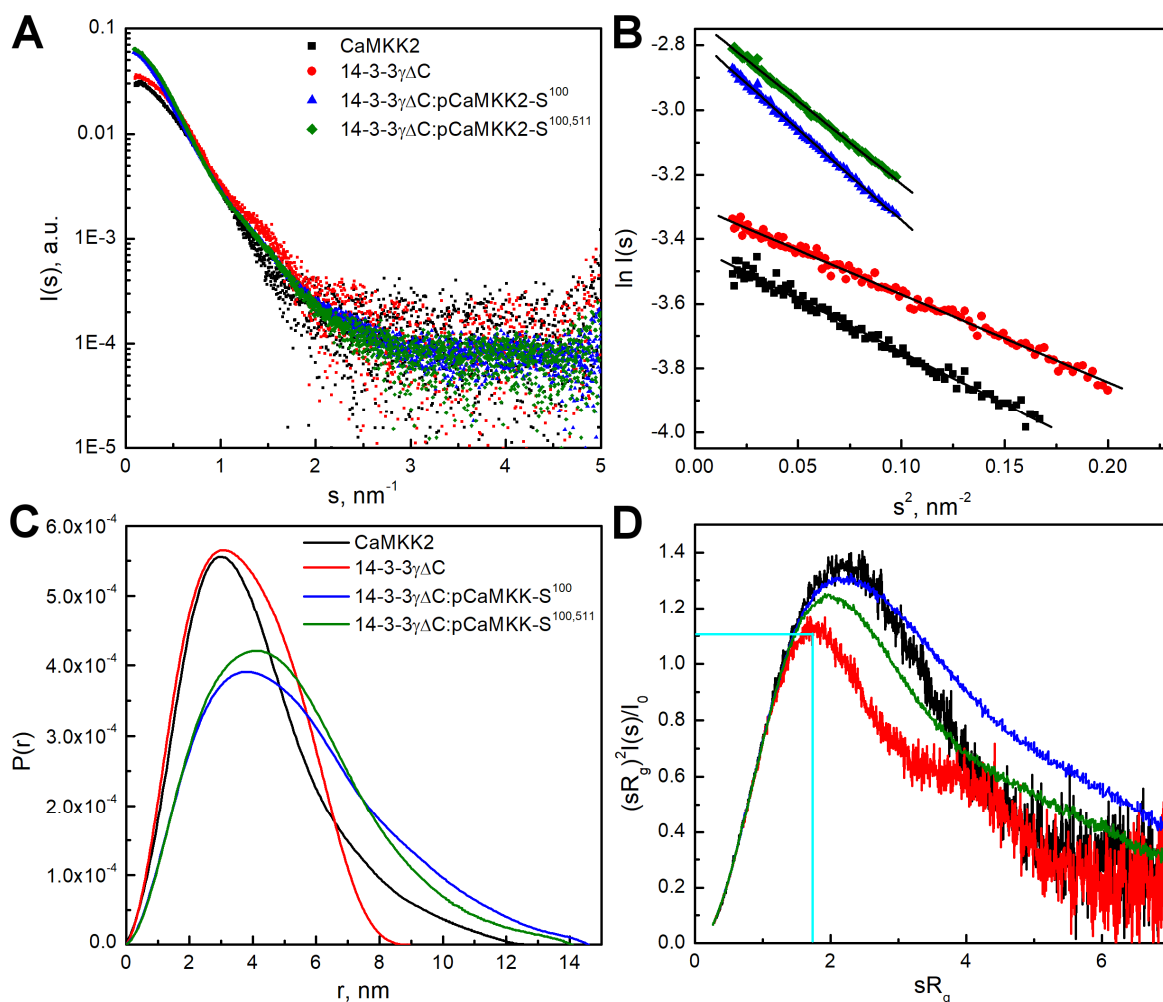
^fMolekulová váha získána z Porodovy rovnice ($M_w \approx V_p \times 0,625$)

^gTeoretické molekulové hmotnosti 14-3-3 γ ΔC dimeru (54,3 kDa), pCaMKK2 (48,0 kDa) a komplexu pCaMKK2:14-3-3 γ ΔC (102,3 kDa)

V souladu s touto predikcí je i Kratkyho výnos⁶, který poukazuje na větší konformační flexibilitu pCaMKK2 i obou komplexů (viz obr. 5.28 D, str. 117) ve srovnání s dimerem 14-3-3 γ ΔC. Pro kompaktní globulární proteiny tato funkce

⁶ $(sR_g)^2 I(s)/I(0)$ v závislosti na sR_g

nabývá maximální hodnoty 1.104 při $sR_g \sim 1.73$ (Receveur-Brechot & Durand, 2012; Burger *et al.*, 2016). Tento předpoklad splňuje pouze červená křivka ve tvaru zvonu pro 14-3-3 $\gamma\Delta$ C, která má maximum 1.1 při $sR_g \sim 1.7$ (pozice vyznačena v obr. 5.28 D).



Obr. 5.28 SAXS analýza komplexu 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2. **A** – Intenzita rozptylu v závislosti na rozptylovém vektoru ($s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, kde 2θ je úhle rozptylu a λ je vlnová délka záření) pro 14-3-3 $\gamma\Delta$ C, pCaMKK2 S100, 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2 S100 a 14-3-3 $\gamma\Delta$ C:pCaMKK2 S100,511 (komplexy byly mícháány ve stechiometrii 2:1). **B** – Guinierova aproximace pro rozptylové křivky z panelu A. **C** – Distribuční funkce vzdáleností $P(r)$ vypočítané z rozptylových dat pomocí programu GNOM. **D** – Normalizované Kratkyho výnosy. Modrozeleně je vyznačeno maximum funkce při hodnotě 1.104 pro $sR_g = 1.73$, které je charakteristické pro kompaktní globulární proteiny.

Pomalejší pokles křivky při vyšších hodnotách sR_g pro komplex pCaMKK2 S100:14-3-3 $\gamma\Delta$ C a vyšší maximum závislosti ve srovnání se vzorkem komplexu pCaMKK2 S100,511:14-3-3 $\gamma\Delta$ C odráží jeho větší konformační flexibilitu. Vyšší míra flexibility může být důsledkem nepřítomnosti fosforylovaného C-koncového motivu (Ser⁵¹¹) při interakci se 14-3-3.

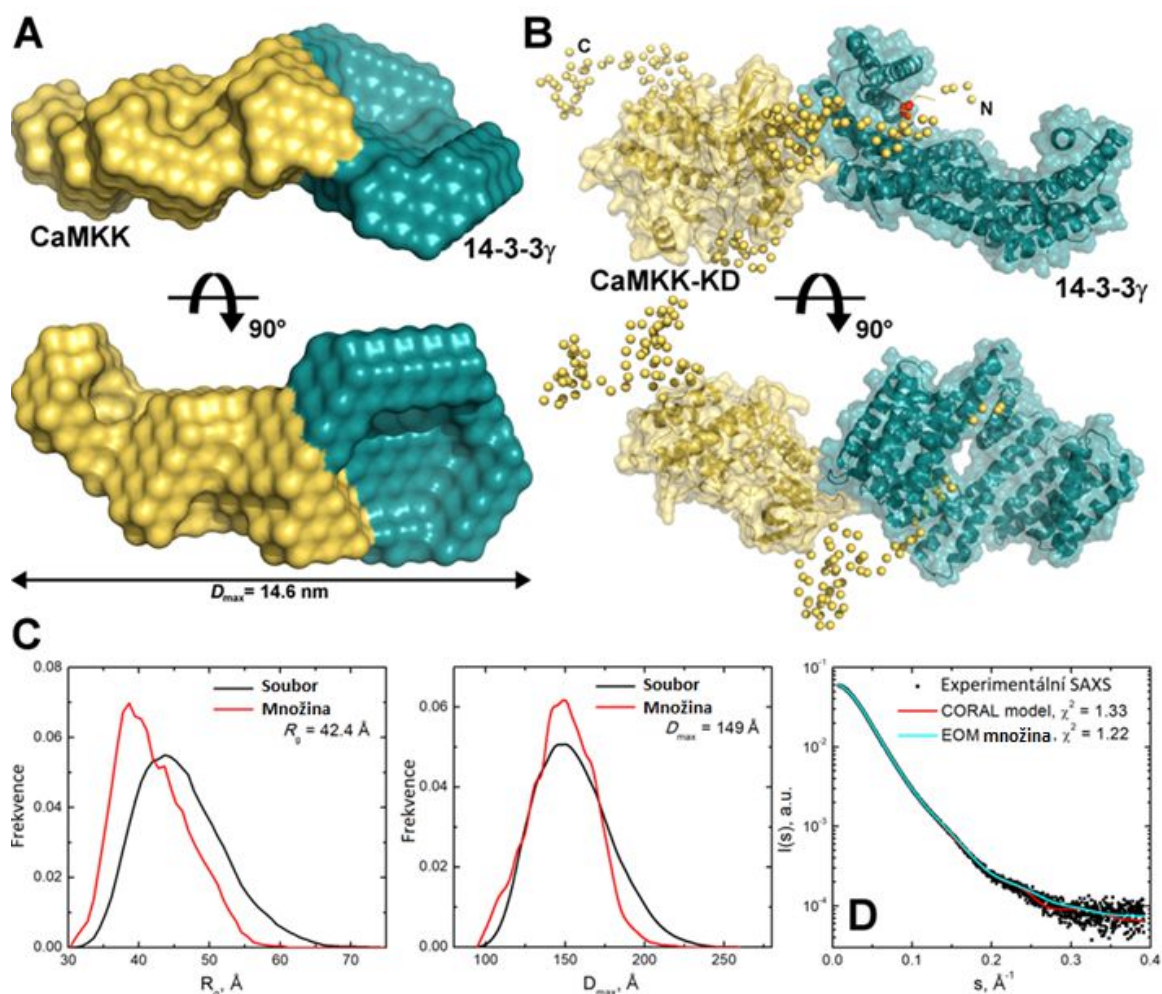
5.4.4 Strukturní modelování komplexu pCaMKK2 S100:14-3-3 $\gamma\Delta$ C

Strukturní modelování na základě SAXSu bylo realizováno pouze v případě komplexu pCaMKK2 S100:14-3-3 $\gamma\Delta$ C, který zastával fyziologicky významnější formu CaMKK2 vzhledem k malé míře fosforylace na zmiňovaném C-koncovém motivu (S511). Z důvodu této heterogenity jsme z analýzy vyloučili komplex pCaMKK2 S100,511:14-3-3 $\gamma\Delta$ C.

Ab initio molekulární obálky byly vygenerovány pomocí programu GASBOR a reprezentativní struktura byla vybrána z dvaceti nezávislých iterací pomocí programu DAMAVER.

Program MONSA fungující na bázi multifázového modelování byl použit ke zjištění relativních pozic 14-3-3 $\gamma\Delta$ C a CaMKK2 S100. Výsledkem jsou *ab initio* molekulární obálky obsahující dvě fáze reprezentující oba proteiny v komplexu (Rambo, 2015). Výsledkem analýzy bylo dvacet nezávislých modelů s velmi podobným tvarem a nízkou střední hodnotou NSD ~ 0.61 . Vybraný finální model (viz obr. 5.29 A, str. 119) pak dobře odpovídal experimentálním SAXS datům. Tvar modelu je asymetrický, kdy se CaMKK2 nachází mimo centrální vazebný kanál 14-3-3 proteinu a interaguje pouze s jedním protomerem 14-3-3 γ .

Rigidní modelování komplexu pCaMKK2 S100:14-3-3 $\gamma\Delta$ C v programu CORAL poskytlo další strukturní detaily o vzájemné prostorové orientaci proteinů v komplexu. Výchozími strukturami pro modelování byly krystalová struktura CaMKK1 a 14-3-3 $\gamma\Delta$ C, nestrukturované oblasti pak byly domodelovány řetězem koulí o velikosti průměrné aminokyseliny. Z obr. 5.29 B je zjevné, že N-koncový 14-3-3 vazebný motiv CaMKK se nachází ve vazebném žlábků 14-3-3 γ (potvrzeno ko-krytalizací peptidu se serinem S100 a 14-3-3 $\gamma\Delta$ C, výsledek součástí publikace Psenakova *et al.*, 2018). Finální CORAL model dobře odpovídá experimentálním SAXS datům (viz. 5.29 D) s hodnotou odchylky $\chi^2 \sim 1.33$ (5.29 B).



Obr. 5.29 *Strukturní modelování komplexu 14-3-3γΔC:pCaMKK2. A* – Multifázová rekonstrukce komplexu 14-3-3γΔC:pCaMKK2 S100 se 14-3-3 fází v modrozelené barvě a CaMKK2 ve žluté barvě **B** – Konformace komplexu 14-3-3γΔC:pCaMKK2 S100 získaná v programu CORAL s použitím krystalových struktur 14-3-3γΔC (PDB kód: 2B05) a kinasové domény CaMKK2 (PDB kód: 2ZV2). Nestrukturované segmenty mimo krystalové struktury byly modelovány pomocí dummy atomů. Reziduum Ser¹⁰⁰ je zvýrazněno červeně. **C** – Distribuční funkce R_g and D_{max} konformací komplexu 14-3-3γΔC:pCaMKK2 S100 pro soubor a množinu konformerů získaných z programu EOM. **D** – Superpozice experimentální rozptylové křivky komplexu s vypočítanými křivkami modelu CORAL (červeně) a množiny konformerů vybraných v programu EOM (modrozeleně).

Strukturní model na obr. 5.29 B nabízí možnost, že interakce mezi pCaMKK S100 a 14-3-3γΔC není zprostředkována pouze skrze N-koncový vazebný motiv CaMKK, ale i přes kontakty kinasové domény s povrchem 14-3-3γΔC. Tato představa

je v souladu s měřením vazebné afinity nativního syntetického CaMKK2 fosfopeptidu KLPS¹⁰⁰LQER vůči 14-3-3 γ , která byla signifikantně nižší ve srovnání s celou sekvencí CaMKK2 S100 (K_D (CaMKK2 S100) $\sim 1\mu\text{M}$ vs K_D (fosfopeptid) $\sim 9\mu\text{M}$). Měření vazebné afinity peptidů bylo provedeno M.Sc. Domenico Lentini Santo.

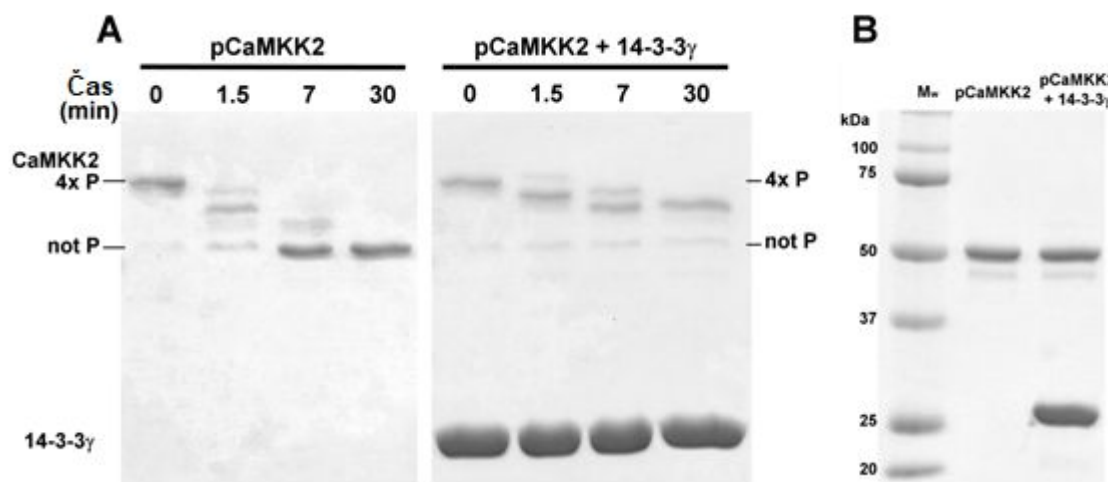
N-koncový vazebný motiv CaMKK a kinasová doména jsou odděleny úsekem 60 aminokyselin, který se ze strukturní predikce jeví jako nestrukturovaný. Z tohoto důvodu je vysoce pravděpodobné, že komplex pCaMKK2 S100:14-3-3 γ ΔC zaujímá více konformačních stavů. Konformační flexibilita byla rovněž potvrzena normalizovaným Kratkyho výnosem (viz obr. 5.28 D, str. 117). Na základě těchto skutečností jsme se rozhodli komplex modelovat souborem konformerů v programu EOM (Tria *et al.*, 2015). Dimer 14-3-3 γ ΔC, 14-3-3 vazebný motiv a kinasová doména CaMKK představovaly rigidní struktury a N- a C-terminální segmenty CaMKK byly domodelovány řetězem koulí reprezentující průměrnou aminokyselinu.

Z počátečního počtu 10.000 konformerů byla pomocí genetického algoritmu vyselektována menší množina konformerů odpovídající experimentálním SAXS datům, s hodnotou $\chi^2 \sim 1,22$ (viz 5.29 D, str. 119). Z distribučních funkcí je zřejmé, že vybraná množina konformerů (červená křivka) zaujímá kompaktnější tvar ve srovnání s celým souborem konformerů (černá křivka), viz obr. 5.29 C. Průměrná hodnota R_g i D_{max} vybrané množiny konformerů ($R_g \sim 42,4 \text{ \AA}$, $D_{\text{max}} \sim 149 \text{ \AA}$) je konzistentní s experimentálními SAXS daty (viz tab. 5.7, str. 116). Výsledky jsou tedy plně v souladu s modelem z programu CORAL i MONSA (5.29 D). Strukturní modelování bylo provedeno prof. Tomášem Obšilem.

5.4.5 Limitovaná defosforylace s využitím SDS-Phos-tag-PAGE

Analytická ultracentrifugace prokázala, že interakce mezi CaMKK2 a 14-3-3 γ je zprostředkována vazbou na fosforylované motivy obsahující Ser¹⁰⁰ a Ser⁵¹¹. V sekvenci CaMKK jsou dále přítomna dvě důležitá PKA fosforylační místa (Thr¹⁴⁵ a Ser⁴⁹⁵), která plní svou funkci při regulaci aktivity CaMKK2. Z tohoto pohledu bylo tedy zajímavé prostudovat vliv vazby proteinu 14-3-3 na protekci těchto PKA fosforylačních míst.

Pro tyto účely byla použita katalyticky inaktivní mutantní varianta CaMKK2, která obsahuje jedinou mutaci D330A. K defosforylaci byla použita králičí protein fosfatasa 1 (PP1, Sigma-Aldrich).



Obr. 5.30 Limitovaná defosforylace pCaMKK2 D330A. **A** – 12% gel z SDS-Phos-tag-PAGE po limitované defosforylaci pCaMKK2 D330A a pCaMKK2 D330A v přítomnosti 14-3-3 γ **B** – Kontrola vzorků fosforylované CaMKK2 D330A a komplexu pCaMKK2 D330A:14-3-3 γ na SDS-PAGE (12% gel). Alikvoty (64 pmol) byly odebírány v čase 0, 1,5, 7 a 30 min defosforylace a reakce byla zastavena přidavkem inhibitoru β -glycerolfosfátu do finální koncentrace 100mM a smísením s SDS redukujícím vzorkovacím pufrem.

Z obr. 5.30 A je patrné, že vazba 14-3-3 γ na CaMKK2 D330A výrazně chrání kinasu před defosforylací vzhledem k mnohem menší abundanci zóny nefosforylovaného proteinu v čase 7 a 30 minut inkubace s PP1. Charakterizace fosforylačního stavu proteinu na studovaných místech v časových bodech 0, 1,5 a 7 minut defosforylace byla provedena pomocí LC-MS/MS. Příprava vzorku byla totožná s přípravou pro Phos-tag gely s výjimkou, že reakce byla zastavena přidavkem 100mM β -glycerolfosfátu a okamžitým zmrazením v kapalném dusíku. Další postup byl shodný s analýzou H/D výměny (viz kap. 4.3.5.1, str. 61). Tab 5.8 shrnuje časovou závislost abundance peptidů obsahujících fosforylační místa Thr¹⁴⁵ a Ser⁴⁹⁵ (viz str. 122). Poměry intenzit nefosforylovaného (not-P) a fosforylovaného peptidu (P) naznačují, že vazba 14-3-3 γ zpomaluje defosforylaci Ser⁴⁹⁵ až do 7. minuty reakce. U peptidu obsahujícího Thr¹⁴⁵ je rovněž možné pozorovat pomalejší kinetiku defosforylace. Výsledky naznačují, že vazba 14-3-3 zpomaluje defosforylaci obou PKA

inhibičních míst a udržuje tak kinasu v inaktivním stavu. Na druhé straně, měření enzymové kinetiky neprokázalo, že by vazba 14-3-3 přímo modulovala aktivitu CaMKK2 jako v případě CaMKK1 (výsledky jsou součástí publikace Psenakova *et al.*, 2018).

Tab. 5.8 Časová závislost abundance dvou peptidů pCaMKK2 D330A obsahujících fosforylační místa Thr145 a Ser495 při defosforylaci v nepřítomnosti a přítomnosti 14-3-3γ. Intenzita byla získána z extrahovaných chromatogramů daného ionu.

Místo	Forma peptidu	m/z	Čas defosforylace (min)					
			Intenzita					
			pCaMKK2			pCaMKK2 + 14-3-3γ		
			0	1.5	7	0	1.5	7
Thr145^a	P	695,9556 (5+)	2.5E+07	2.8E+07	2.2E+07	2.0E+07	4.0E+07	1.6E+07
	not-P	679,9625 (5+)	1.3E+07	3.3E+07	3.7E+07	1.3E+07	1.3E+07	3.2E+07
	Poměr not-P/P		0.52	1.2	1.7	0.65	0.33	2.0
Ser495^b	P	570,2900 (5+)	2.3E+07	2.5E+07	5.4E+06	1.8E+06	4.0E+06	4.2E+06
	not-P	554,2970 (5+)	0.0E+00	2.9E+06	6.2E+06	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	Poměr not-P/P		0	0.12	1.1	0	0	0

^aSekvence: PSLPYSPVSSPQSSPRLPRRPT¹⁴⁵VESHHVSIT

^bSekvence: VKTMIRKRS⁴⁹⁵FGNPFEGSRREERS

5.5 Biofyzikální a strukturní charakterizace komplexu

CaMKK2:Ca²⁺/CaM

5.5.1 SAXS

Kinasová doména CaMKK vykazuje strukturní odlišnosti od katalytických domén jiných zástupců z rodiny CaMK. Za prvé, obsahuje flexibilní úsek bohatý na aminokyseliny Arg a Pro a Gly, zvaný RP insert, který se uplatňuje při rozpoznávání substrátu (Tokumitsu *et al.*, 1999). Za druhé, se liší sekvencí a délkou AID⁷. Za třetí,

⁷ AID – autoinhibiční doména

struktura CaMKK2 zcela postrádá helix αD , který se nachází u CaMKI i CaMKII a interaguje skrze hydrofobní interakce s AID (Kukimoto-Niino *et al.*, 2011a). Z těchto strukturních rozdílů CaM kinas vyplývá i rozmanitost aktivačních mechanismů vazbou Ca^{2+} /kalmodulinu. Z krystalových struktur CaMKI a CaMKII v aktivovaném a inhibovaném stavu vyplývá, že vazba kalmodulinu vyvolává konformační změnu i na úrovni sekundární struktury. Vazba kalmodulinu na autoregulační segment CaMKII (296-316) indukuje novou helikální strukturu na C-konci, která je pevně obklopena oběma doménami kalmodulinu. Při této interakci se kalmodulin vzdaluje od kinasové domény (Rellos *et al.*, 2010). Naopak krystalová struktura komplexu mezi DAPK a CaM nabízí jiný způsob aktivace, při kterém dochází k přímé interakci mezi kalmodulinem a kinasovou doménou (de Diego *et al.*, 2010). Měření NMR prokázalo, že peptid CaMKK1 CBD⁸ se nachází v komplexu s kalmodulinem v opačné orientaci než většina zástupců CaM kinas, což je další indicie, že i CaMKK2 může být regulována zcela odlišným mechanismem (Racioppi & Means, 2012; Osawa *et al.*, 1999).

Abychom získali hlubší náhled do struktury a dynamiky komplexu, využili jsme opět techniky SAXS jako v předchozích případech. Společně s daty z chemického zesíťení, H/D výměny a molekulového dokování se nám podařilo objasnit architekturu komplexu CaMKK2: Ca^{2+} /CaM.

Tab. 5.9 Strukturní parametry získané ze SAXS

	<i>c</i> (mg.ml ⁻¹)	<i>R_g</i> ^a (Å)	<i>R_g</i> ^b (Å)	<i>D_{max}</i> (Å)	<i>V_p</i> ^c (nm ³)	<i>M_w</i> ^{d,f} (kDa)	<i>M_w</i> ^{e,f} (kDa)
CaMKK2	2,8	32,6 ± 0.3	32,7 ± 0.3	126	95,6	48 ± 1	60
	2,1	32,1 ± 0.3	32,2 ± 0.3	125	94,0	46 ± 1	59
Ca ²⁺ /CaM	3,9	22,2 ± 0.1	22,2 ± 0.1	71	27,6	20 ± 1	17
	1,9	22,2 ± 0.3	22,3 ± 0.1	67	28,1	21 ± 1	18
Complex (1:1)	5,8	38,4 ± 0.5	38,6 ± 0.5	124	112,1	66 ± 1	70
	2,4	37,1 ± 0.4	37,3 ± 0.4	120	110,0	64 ± 1	69

^a*R_g* získané z recipročního prostoru

^b*R_g* získané z reálného prostoru

^cPorodův objem

^d Molekulová váha získána ze srovnání intenzity rozptylu v přímém směru *I*(θ) s rozptylem referenčního roztoku hovězího sérového albuminu

^eMolekulová váha získána z Porodovy rovnice ($M_w \approx V_p \times 0,625$)

^fTeoretické molekulové hmotnosti: CaMKK2 (48 kDa), Ca²⁺/CaM (17 kDa) a komplexu CaMKK2:Ca²⁺/CaM (65 kDa)

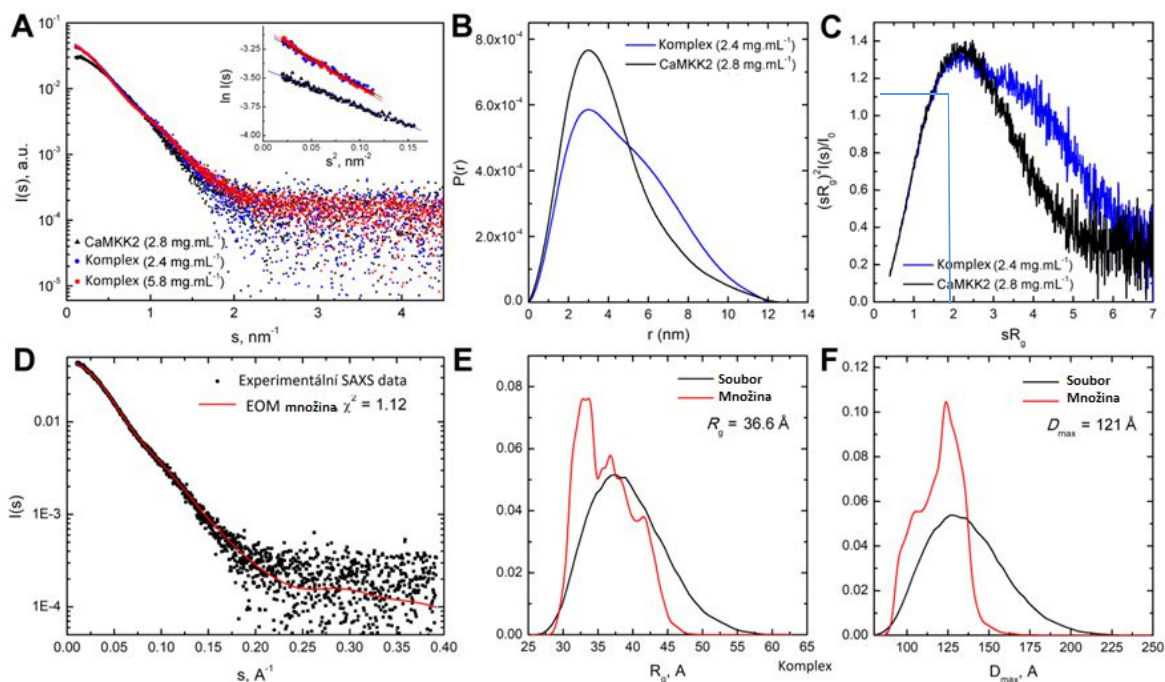
⁸ CBD – kalmodulin-vazebná doména

SAXS data byla naměřena pro samotnou CaMKK2 S100, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ a komplex CaMKK2: $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ v molárním poměru 1:1. Vzorky komplexu byly připraveny v rozmezí koncentrací 2,4 až 10,7 mg.ml^{-1} , ale pouze vzorky při nízkých koncentracích (2,4 a 5,8 mg.ml^{-1}) byly monodisperzní bez náznaku agregace, což dokazuje i linearita Guinierova výnosu na obr. 5.31 A (viz str. 125). Pro další analýzu byla použita rozptylová křivka vzorku při koncentraci 2,4 mg.ml^{-1} . Vypočítané zdánlivé molekulové hmotnosti jsou v souladu s očekávanými molekulovými hmotnostmi samotné kinasy, kalmodulinu i komplexu (viz tab. 5.9, str. 123).

Párové distribuční funkce $P(r)$ samotné CaMKK2 i komplexu vykazují podobnou vzdálenost D_{max} , nicméně v komplexu je větší zastoupení meziatomových vzdáleností v rozmezí 6-10 nm (obr. 5.31 B).

Normalizované Kratkyho výnosy nám poskytují informaci ohledně flexibility proteinového řetězce (viz obr. 5.31 C). Vyznačený bod na obr. 5.31 C odpovídá maximu pro kompaktní globulární proteiny. Je zjevné, že CaMKK2 i komplex vykazují větší maxima, což vypovídá o jejich zvýšené konformační flexibilitě. Z toho důvodu jsme opět přistoupili k metodě EOM, která vybere set konformerů nejlépe odpovídajícím experimentálním datům. V této analýze kinasová doména a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ vázaná na CBD představovaly rigidní struktury a N- a C-terminální segmenty CaMKK byly domodelovány řetězem koulí reprezentující průměrnou aminokyselinu.

Vybraná množina konformerů (červená křivka) vykazuje shodu s experimentálními daty s hodnotou $\chi^2 \sim 1.12$. Distribuční funkce gyračních poloměrů i maximální meziatomové vzdálenosti vybrané množiny zaujímají kompaktnější tvar ve srovnání s celkovým souborem konformerů (černá křivka), viz obr. 5.31 E a F. Průměrné hodnoty R_g (36.6 Å) a D_{max} (121 Å) jsou konzistentní s experimentálními SAXS daty (viz tab. 5.9, str. 123), navíc z jejich distribuce vyplývá, že ~ 50% konformerů zaujímá kompaktní tvar s hodnotami $R_g < 35$ Å a $D_{\text{max}} < 120$ Å. Tato pozorování nás opět přivádí k předpokladu přímé interakce mezi kinasovou doménou a $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Strukturní modelování bylo provedeno prof. Tomášem Obšilem.



Obr. 5.31 SAXS analýza komplexu $\text{CaMKK2:Ca}^{2+}/\text{CaM}$. **A** – Intenzita rozptylu v závislosti na rozptylovém vektoru ($s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$, kde 2θ je úhly rozptylu a λ je vlnová délka záření) pro CaMKK2 a komplex $\text{CaMKK2:Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Komplex byl připraven v molárním poměru 1:1. Guinierovy výnosy jsou vloženy v obrázku **A**. **B** – Distribuční funkce vzdáleností $P(r)$ vypočítané z experimentálních dat pomocí programu GNOM. **C** – Normalizované Kratkyho výnosy. Maximum funkce při hodnotě 1.104 pro $sR_g = 1.73$, je charakteristické pro kompaktní globulární proteiny. **D** – Superpozice experimentální rozptylové křivky komplexu s vypočítanými křivkami pro soubor konformerů vybraných v programu EOM. Distribuční funkce gyračních poloměrů R_g (**E**) and maximálních vzdáleností D_{\max} (**F**) pro různé konformace komplexu $\text{CaMKK2:Ca}^{2+}/\text{CaM}$ z množiny konformerů vybraných v programu EOM.

5.5.2 H/D výměna spojená s hmotnostní spektrometrií

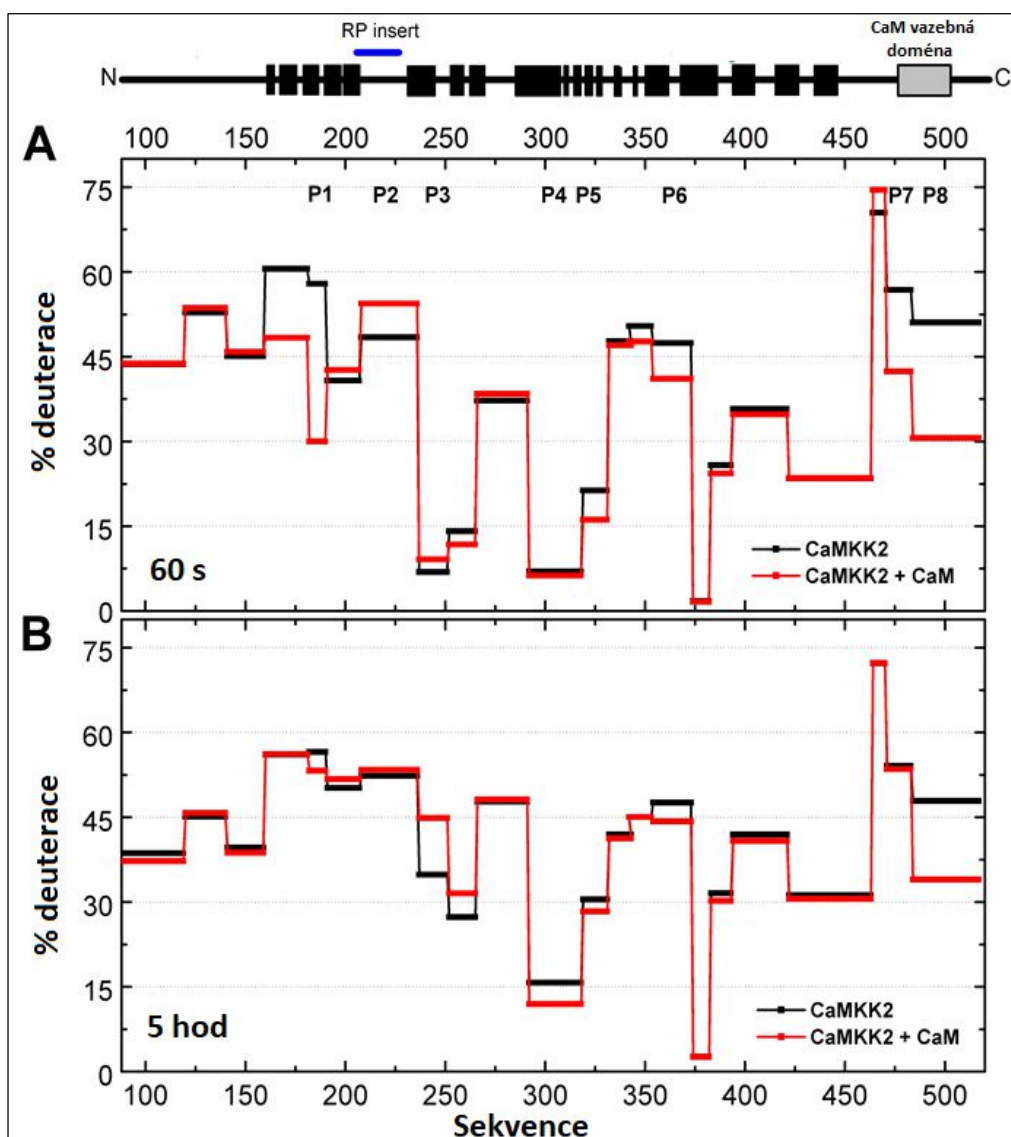
Pro bližší charakterizaci interakce a vazebného rozhraní mezi CaMKK2 a CaM byla použita metoda vodík/deuteriové výměny s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Bližší postup přípravy vzorku je uveden v kap. 4.3.5.1 (viz str. 61).

Deuterace samotné CaMKK2 a komplexu CaMKK2:CaM (ve stechiometrii 1:1) byla sledována v různých časových intervalech. V rámci této práce jsou prezentovány dva časy (60 s a 5 hod), které dobře popisují dynamiku interakce mezi CaMKK2 a CaM a strukturní úseky CaMKK2 , které jsou touto vazbou ovlivněny. Deuterace

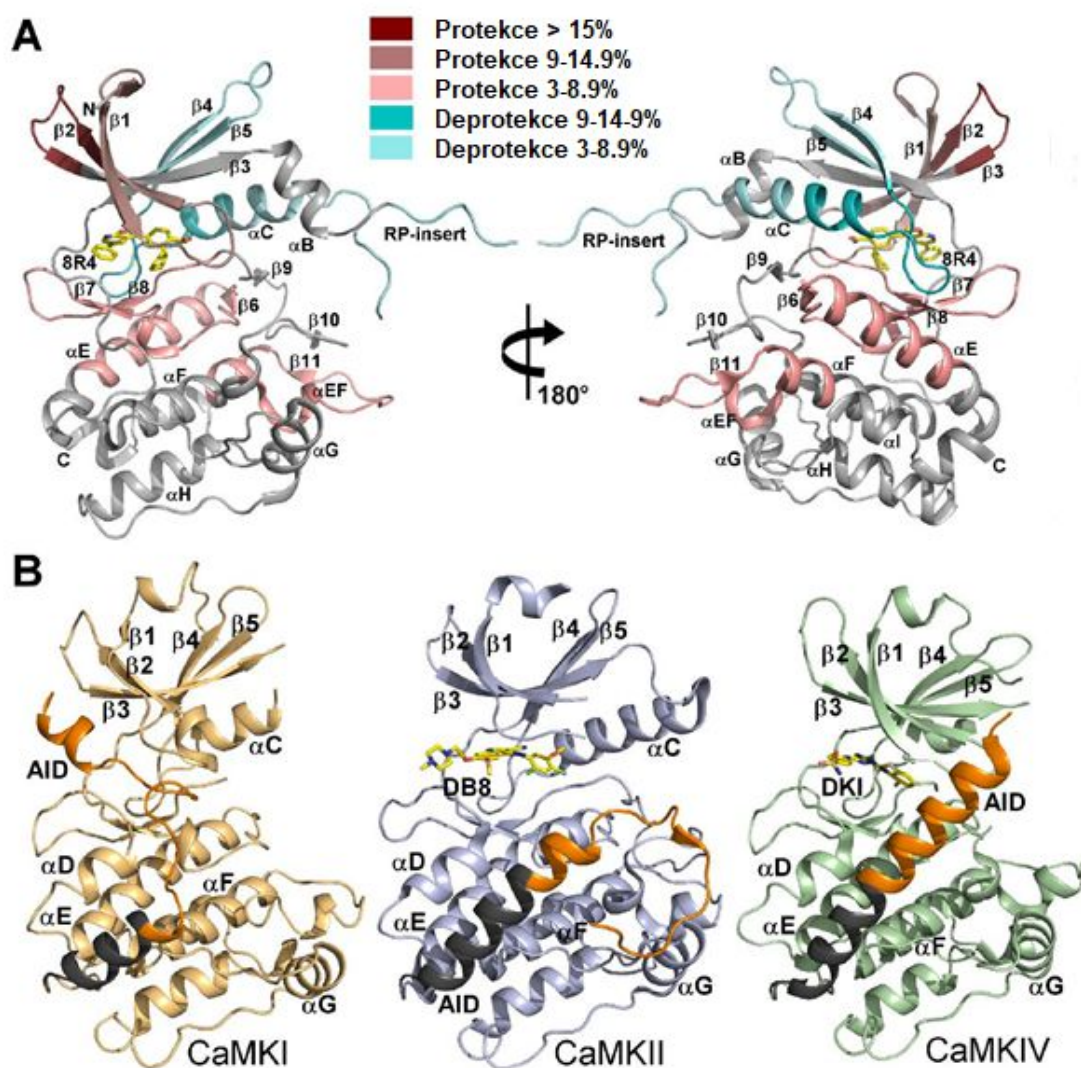
v nejdelším čase (5 hod) představující stacionární stav byla rovněž použita pro konstrukci výsledného modelu interakce mezi CaMKK2 a CaM. Protekční výnosy byly konstruovány pomocí 22 peptidů pokrývajících celou sekvenci CaMKK2 (viz obr. 5.32, str. 127). Oblasti kinasové domény (KD), kde byly pozorovány změny v kinetice H/D výměny jsou vizualizovány na obr. 5.33 a 5.34 na krystalové struktuře CaMKK2 KD (viz str. 128-129). Nejvýraznější změny v kinetice výměny z hlediska vyšší protekce jsou pozorovány v oblasti CBD, dále pak v několika oblastech v rámci N-koncového laloku ($\beta 1$, $\beta 2$ a smyčka mezi $\beta 2$ a $\beta 3$) a ve dvou oblastech C-koncového laloku (viz obr. 5.32, 5.33 a 5.34, str. 127-129).

První oblast ze C-subdomény obsahuje helix αE a řetězce $\beta 6$ a $\beta 8$, které vytváří jednu stranu ATP vazebného místa. Druhá oblast z C-subdomény, zahrnuje αEF , $\beta 11$ a N-konec helixu αF (viz obr. 5.33, str. 128). Výrazná změna v oblasti CBD (470-517, peptidy P7 a P8 – viz obr. 5.32), odráží fakt, že je plně ponořena dovnitř Ca^{2+}/CaM , jak bylo dříve popsáno pro interakci mezi CBD peptidem CaMKK1 a Ca^{2+}/CaM (Osawa *et al.*, 1999). Pomalejší inkorporace deuteria v těchto oblastech kinasové domény může být důsledkem strukturní stabilizace po narušení vazebných interakcí mezi AID a kinasovou doménou. Případně může pomalejší kinetika poukazovat na sníženou přístupnost rozpoztědlu v důsledku interakce se segmentem AID-CBD s navázaným Ca^{2+}/CaM .

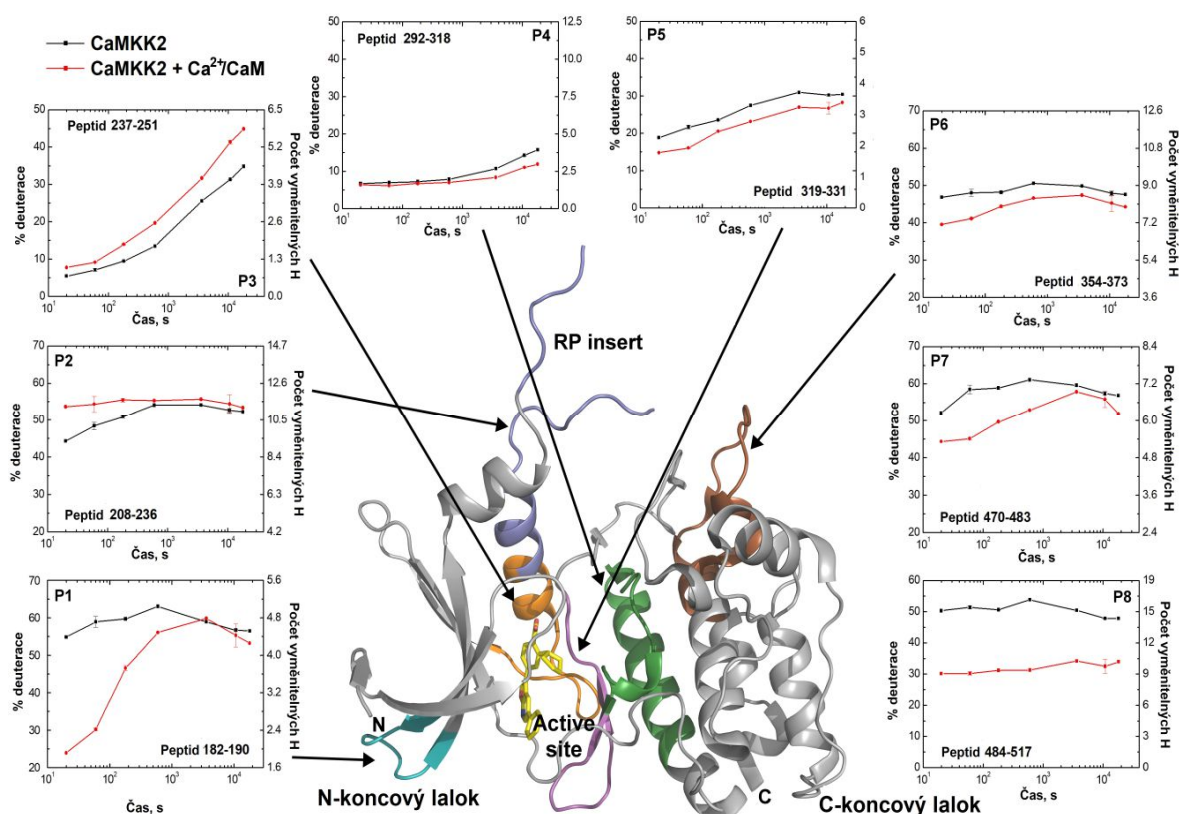
Oproti tomu rychlejší kinetika H/D výměny signalizuje větší dynamiku, zvýšenou přístupnost rozpouštědlu nebo strukturní destabilizaci. Signifikantní nárůst rychlosti výměny byl pozorován pro oblast 208-236 a 237-251 uvnitř N-koncového laloku, které zahrnují důležitý RP insert, $\beta 4$, $\beta 5$ a helix αC (viz obr. 5.33 a 5.34, str. 128-129). Zvýšená deproteckce v této oblasti může být důsledkem narušení interakce mezi AID segmentem a kinasovou doménou na základě aktivace Ca^{2+}/CaM . Na druhé straně pomalejší kinetika v oblastech 292-318 a 319-331 (peptidy P4 a P5, obr. 5.32 a 5.34) může být spojena s konformační změnou při uvolnění AID z kinasové domény. Tyto dva peptidy obsahují C-koncový helix αE a úsek obsahující řetězce $\beta 6$ - $\beta 8$, které se nachází v blízkosti oblasti se zvýšenou vodík/deuteriovou výměnou při vzniku komplexu.



Obr. 5.32 Deuterační profil samotné CaMKK2 (černá) a CaMKK2 v komplexu s $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (červená) v čase 60 s (A) a 5 hod (B). Schématické zobrazení doménové struktury CaMKK2, RP insert a CaM vazebné místo jsou znázorněny nad grafem.



Obr. 5.33 Vazba $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ indukuje strukturní změny v rámci kinasové domény. **A** – Barevně vyznačené oblasti kinasové domény ovlivněné vazbou $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Krystalová struktura kinasové domény CaMKK2 s inhibítor 8R4. PDB kód: 5UY6. **B** – Porovnání se strukturou ostatních CaM kinas. Struktury CaMKI KD-AID (PDB ID: 1A06) (Goldberg *et al.*, 1996), CaMKII KD-AID (PDB ID: 3SOA) (Chao *et al.*, 2011) a CaMKIV KD-AID (PDB ID: 2W40) ve stejné orientaci jako CaMKK2 KD v panelu A. Pro lepší názornost není ve struktuře CaMKII přítomna C-koncová hub doména. Autoinhibiční segmenty jsou zvýrazněny šedou barvou a CBD oranžově.



Obr. 5.34 Detailní pohled na kinetiku H/D výměny pro vybrané peptidy z obr. 5.30 u samotné CaMKK2 (černá) a CaMKK2 v přítomnosti s $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (červená). Vodík/deuteriová výměna je prezentována ve formě procent vztaženém k maximální teoretické úrovni deuterace (vlevo osa y) a ve formě počtu vyměněných protonů (vpravo osa y). Pozorované změny v rámci kinasové domény (peptidy P1-P6) jsou vizualizovány na krystalové struktuře CaMKK2 KD (PDB kód: 5UY6). Body v čase 1min, 3min a 3hod byly měřeny v triplicátech pro určení SD a signifikance výsledku.

Ze strukturních studií ostatních CaMK vyplývá, že AID je lokalizován mezi αD a αE , přičemž ovlivňuje pozici helixu αD a konformaci reziduí v ATP-vazebném místě. (Goldberg *et al.*, 1996; Rosenberg *et al.*, 2005; Chao *et al.*, 2011)(viz obr. 5.33, str. 128). V některých případech bylo dokonce pozorováno, že AID přímo zasahuje do ATP-vazebného místa (Goldberg *et al.*, 1996). V tomto případě vše nasvědčuje tomu, že CaMKK2 AID interaguje přes odlišný povrch vymezený řetězcí β4 , β5 a helixem αC nacházející se na opačné straně kinasové domény.

5.5.3 Chemické zesíťení spojené s hmotnostní spektrometrií

Chemické zesíťení kombinované s hmotnostní spektrometrií bylo využito k ověření přímých kontaktů mezi kinasovou doménou CaMKK2 S100 (CaMKK2 KD) a kalmodulinem a k získání dalších strukturních informací o vzájemných relativních pozicích. Vzhledem k absenci strukturních dat u CaMKK2 v N a C-koncových oblastech molekuly, bylo možné ověřit pouze ta spojení, jejichž rezidua se nachází v rámci známé krystalové struktury kinasové domény. Pro tyto účely byla použita dvě síťovací činidla reagující s primárními aminy lysinů – disukcinimidyl glutarát a disukcinimidyl suberát. Tato činidla se liší délkou spojovacího raménka (DSS ~ 11,4 Å, DSG ~ 7,7 Å), což umožňuje detekovat různé vzdálenosti mezi lysiny v rámci molekuly nebo molekuly komplexu. Při validaci těchto kovalentních spojení je nutné zohlednit flexibilitu proteinových řetězců a proto se za optimální vzdálenost mezi alfa-uhlíky lysinů obecně považuje 20 Å pro DSG a 24 Å v případě DSS (Rozbesky *et al.*, 2012). Identifikovaná intermolekulární spojení propojují tři různé oblasti kinasové domény CaMKK2 se třemi různými oblastmi CaM, viz tabulka 5.10 (viz str. 131). Ve dvou případech nebylo možné identifikovat přesné reziduum, protože odpovídající peptid obsahoval dva přilehlé lysiny Lys⁷⁶ a Lys⁷⁸. Spojení č. 1 a 3 propojují Lys⁴⁹³ z CaMKK2 AID-CBD s Lys¹⁴⁹ z C-konce kalmodulinu. Spojení č. 2 a 5 byla identifikována mezi Lys⁴⁴¹ z helixu α I na C-konci kinasové domény CaMKK2 a linkerem spojujícím N- a C-terminální doménu CaM, obsahující již zmiňované Lys⁷⁶ a Lys⁷⁸. Spojení č. 4 propojuje opět Lys⁴⁹³ z CaMKK2 AID-CBD s Lys⁷⁸ z kalmodulinu. Poslední spojení č. 6 bylo nalezeno mezi Lys²⁵⁰ nacházejícím se v rámci beta-struktury β 4 v N-terminálním laloku CaMKK2 a Lys¹⁴ uvnitř N-koncového helixu kalmodulinu.

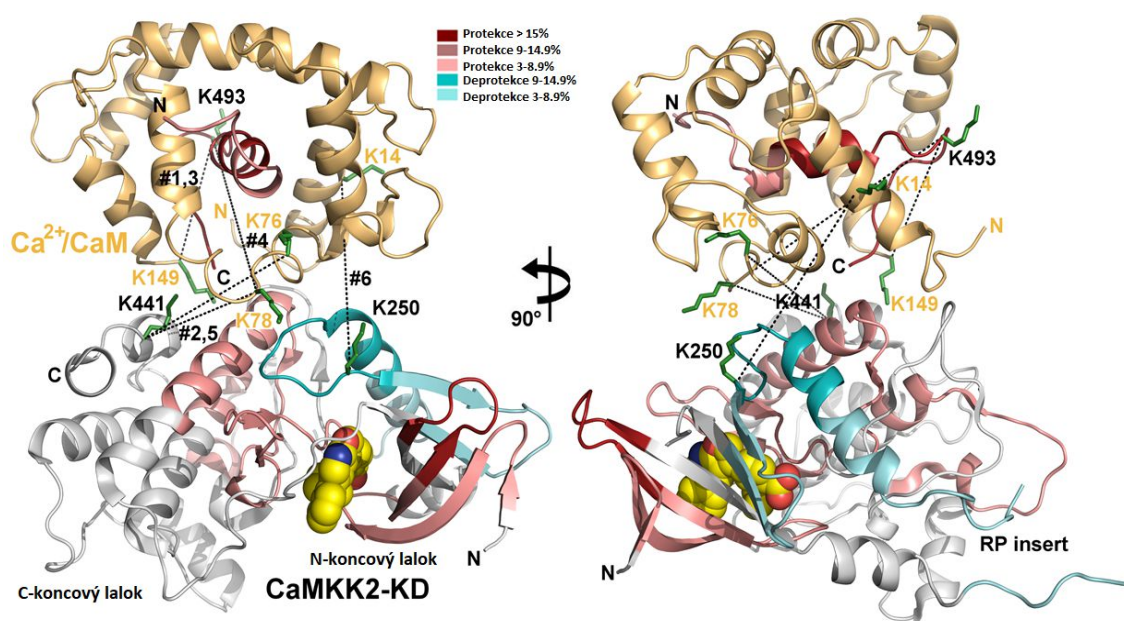
Tab. 5.10 Intermolekulární spojení mezi CaMKK2 a CaM získaných z reakcí s DSS a DSG

		Cross-linked peptides		Cross-linked residues	Observed mass	Theoretical mass	Error (ppm)
		CaMKK2	CaM	CaMKK2–CaM			
DSG^a	1	493-494	128-149	K493–K149	2888,31	2888,31	0,40
	2	430-448	76-78	K441–(K76, K78)	2787,53	2787,53	-1,03
DSS^a	3	493-494	128-149	K493–K149	2930,36	2930,36	0,06
	4	493-494	77-87	K493–K78	1792,87	1792,87	0,19
	5	430-448	76-78	(K441–K76, K78)	2829,58	2829,58	-1,30
	6	243-250	1-14	K250–K14	2769,37	2769,37	0,57

5.5.4 Strukturní modelování komplexu CaMKK2 KD:Ca²⁺/CaM

K vizualizaci strukturních informací z chemického zesíťení a H/D výměny bylo využito modelování v programu HADDOCK, které provedla Dr. Katarína Pšenáková (Dominguez *et al.*, 2003). Jako výchozí struktura pro modelování byla použita krystalová struktura kinasové domény CaMKK2 KD (PDB ID: 5UY6) a NMR struktura Ca²⁺/CaM vázaného na CaMKK1 CBD (PDB ID: 1CKK) (Osawa *et al.*, 1999). Meziatomové vzdálenosti byly vymezeny na základě výsledků chemického zesíťení. Oblasti CaMKK2 KD, které prokázaly zvýšenou míru protekce po 5 hodinách deuterace v přítomnosti Ca²⁺/CaM (182-190, 292-341, 354-473), byly vybrány jako součást vazebného rozhraní.

Jako finální model byla použita struktura s nejnižší intermolekulární energií, která byla konzistentní s většinou spojení získaných chemickým zesíťením (viz tab. 5.10 a obr. 5.35, str. 132). Model navrhuje, že CaMKK2 KD interaguje s Ca²⁺/kalmodulinem skrze povrch tvořený C-koncovou oblastí helixu α E, což potvrzuje potlačení vodík/deuteriové výměny v této oblasti při tvorbě komplexu. Zvýšená protekce ve smyčkách β 2– β 3 a α EF– β 11 (viz obr. 5.33-5.34, str. 128-129) po 5 hodinách deuterace však naznačuje, že Ca²⁺/kalmodulin může interagovat i s těmito oblastmi.



Obr. 5.35 Model komplexu *CaMKK2 KD:Ca²⁺/CaM*. Tento model byl připraven s pomocí programu HADDOCK s využitím krystalové struktury kinasové domény *CaMKK2* (PDB kód: 5UY6), struktury $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ vázaném na kalmodulin vazebnou doménu *CaMKK1* (PDB ID: 1CKK) a intermolekulárních spojení. Struktura *CaMKK2* je zvýrazněna barevně dle výsledků H/D výměny v přítomnosti $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Osawa *et al.*, 1999).

6 DISKUZE

6.1 Interakce mezi proteinkinasou ASK1 a TRX1

ASK1 hraje klíčovou roli v regulaci buněčné apoptosy a produkci cytokinů při oxidativním stresu. V klidovém stavu buňky ASK1 vytváří neaktivní multiproteinový komplex zvaný ASK1 signalosom, jehož jádro vytváří proteiny ASK1, ASK2 a proteiny 14-3-3, které fungují jako inhibitory (Tobiume *et al.*, 2002; Federspiel *et al.*, 2016; Goldman *et al.*, 2004). Zdá se, že složení tohoto komplexu je značně variabilní v závislosti na redoxním stresu a analýza jeho jednotlivých prvků je značně ztížena dynamikou procesu. V regulaci proto zůstává mnoho otazníků, včetně úlohy vazby thioredoxinu, který patrně funguje jako primární inhibitor v N-koncové části proteinu, kde brání oligomerizaci ASK1 a její následné aktivaci (Fujino *et al.*, 2007). Vzájemná interakce je podmíněna přítomností cysteinů v katalytickém motivu thioredoxinu, které při oxidaci vytváří disulfidickou vazbu vedoucí k disociaci komplexu (Saitoh *et al.*, 1998). Mizivé informace ohledně struktury ASK1-TBD a jejího vazebného rozhraní s thioredoxinem jsou hlavním důvodem, proč nebyl molekulární mechanismus této regulace doposud objasněn.

V rámci toho projektu nás zajímala strukturní podstata interakce mezi ASK1-TBD a TRX1 v redukujícím a oxidujícím prostředí. V první fázi jsme charakterizovali komplex mezi nativními proteiny v redukčním prostředí, poté jsme přistoupili k cílové mutagenезi cysteinů obou proteinů a nakonec k oxidačním experimentům za účelem testování jejich vlivu na vzájemnou interakci.

Pro tyto účely bylo testováno několik konstruktů ASK1-TBD v rozmezí 46-302, které byly navrženy v souladu s predikcí sekundární struktury. Jediný z konstruktů, zahrnující sekvenci 88-302 s C-terminální histidinovou kotvou, vykazoval nejlepší úroveň bakteriální exprese a optimální míru kvality pro další studie. Schopnost vazby thioredoxinu byla ověřena jak pomocí nativní elektroforézy, tak pomocí analytické ultracentrifugace. Sedimentační analýza směsi ASK1-TBD s TRX1 v redukujícím prostředí potvrdila, že oba proteiny vytváří stabilní komplex s vazebnou stechiometrií 1:1 a disociační konstantou $K_D \sim 0,3 \mu\text{M}$ (viz obr. 5.8, str. 84). Vzhledem k jasným ukazatelům, že vzájemná interakce je dependentní na přítomnosti

katalytických cysteinů Cys³² a Cys³⁵ (Saitoh *et al.*, 1998; Liu, 2002; Fujino *et al.*, 2007) byly vytvořeny mutantní varianty TRX1 CS, TRX1 C32S a TRX1 C35S. Ze sedimentační analýzy těchto proteinů ve směsi s ASK1-TBD vyplynulo, že pouze TRX1 C32S ($K_D \sim 12\mu\text{M}$) a TRX1 CS ($K_D \sim 1\text{mM}$) vážou ASK1-TBD se signifikantně nižší vazebnou afinitou než WT (viz obr. 5.10 A, str. 86 a obr. 5.11, str. 87). Vazebná afinita mezi TRX1 CS a ASK1-TBD je natolik nízká, že za fyziologických koncentrací v prostředí buňky je tato interakce nereálná. Významý pokles u afinity v případě TRX C32S signalizuje, že Cys³² je pro vazbu naprosto zásadní. Z dvojice katalytických cysteinů je cystein na pozici 32 lokalizován na povrchu proteinu, má signifikantně nižší pK_a ($\sim 6,7$) a nachází se ve formě thiolátového iontu (Kallis & Holmgren, 1980). Autoři studie Nadeau *et al.* (2009) již dříve spekulovali, že interakce mezi ASK1-TBD a thioredoxinem je zprostředkována tvorbou mezimolekulárního disulfidu mezi Cys²⁵⁰ a Cys³². Takový mechanismus je však v redukujícím prostředí cytosolu značně nepravděpodobný a provedení denaturující SDS-PAGE elektroforézy za neredukujících podmínek tuto hypotézu vylučuje (viz obr. 5.9, str. 85). Nicméně lze předpokladat, že thiolátový ion může být zapojen do coulombických interakcí s ASK1-TBD a narušení této interakce uzavřením disulfidického můstku Cys³²-Cys³⁵ nebo jeho mutagenese vede k destabilizaci komplexu.

Uvnitř katalytického motivu se dále nachází Trp³¹, který při oxidaci cysteinů nebo jejich nahrazení seriny prochází konformační změnou. Z krystalové struktury vyplývá, že v redukované formě tato aminokyselina vykazuje určitou míru nestrukturovanosti, ale při oxidaci nabývá definované struktury (Weichsel *et al.*, 1996). Proto je důvodné se domnívat, že vliv na destabilizaci komplexu v případě mutace cysteinů může mít právě i tato konformační změna. Výsledky měření sedimentační analýzy a časově rozlišené fluorescence jsou v souladu s touto představou. Za prvé, mutace W31F měla razantní dopad na vazebnou afinitu vůči ASK1-TBD ($K_D \sim 30\mu\text{M}$) (viz obr. 5.10 B, str. 86). Za druhé, měření časově rozlišené fluorescence ukázalo, že při tvorbě komplexu dochází k nárůstu střední doby života excitovaného stavu τ_{mean} a k potlačení segmentální dynamiky v blízkém okolí Trp³¹ (viz tab. 5.2, str. 92 a obr. 5.14, str. 93). Vyšší hodnota τ_{mean} a pomalejší pokles depolarizace fluorescence Trp³¹ v přítomnosti ASK1-TBD je patrně důsledkem snížené segmentální mobility katalytického motivu ³¹WCGPC³⁵ a snížené přístupnosti

okolního polárního prostředí. Vzhledem k tomu, že je tento tryptofan exponován na povrchu proteinu, lze tyto změny přisuzovat jeho přímé interakci s ASK1-TBD.

Molekula thioredoxinu obsahuje další cysteiny 62 a 69 mimo aktivní centrum. Jejich oxidace v silných oxidačních podmínkách vyvolává tvorbu druhého intramolekulárního disulfidu, který narušuje konformaci thioredoxinu doprovázenou ztrátou katalytické aktivity (Hashemy & Holmgren, 2008; Watson *et al.*, 2003). Mutageneze těchto cysteinů však neprokázala téměř žádný vliv na vazebnou afinitu vůči ASK1-TBD (viz obr. 5.11 D-E, str. 87).

V rámci oxidačních experimentů se nám podařilo nalézt takové podmínky, při nichž dochází k uzavření disulfidického můstku v katalytickém centru Cys³²-Cys³⁵ a nebo obou intramolekulárních disulfidických můstků TRX1 (viz tab. 5.5, str. 100). Obě oxidované formy vykazovaly srovnatelnou a přibližně 10x nižší vazebnou afinitu než redukovaný TRX1 (viz obr. 5.17 B-C, str. 102), což naznačuje, že klíčovým faktorem pro disociaci komplexu je uzavření disulfidického můstku v katalytickém centru TRX1. Disociace komplexu při fyziologickém oxidativním stresu vede k aktivaci ASK1. Oxidace thioredoxinu již za mírných podmínek a z toho plynoucí destabilizace komplexu je důkazem nesmírné senzitivity tohoto regulačního mechanismu.

Dříve bylo naznačeno, že Cys²⁵⁰ z ASK1-TBD zastává určitou roli při interakci s thioredoxinem, protože jeho mutace vedla k potlačení vazby (Zhang, 2004). Cílená mutageneze 6 cysteinů ASK1-TBD (Cys¹⁸⁵, Cys²⁰⁰, Cys²⁰⁶, Cys²²⁵, Cys²²⁶ a Cys²⁵⁰) a experimenty sedimentační analýzy ukázaly, že pouze mutace na pozici 250 měla signifikantní dopad na vazebnou afinitu vůči TRX1 ($K_D \sim 50 \mu M$, viz obr. 5.12, str. 89). Význam tohoto cysteinu pro interakci však zatím nebyl objasněn. Měření časově rozlišené fluorescence dokládají, že interakce mezi oběma proteiny má odlišný charakter než v případě WT (viz tab. 5.2, str. 92). Cys¹²⁰ byl z analýzy vyloučen, neboť měření diferenční skenovací fluorimetrie prokázalo jeho značnou nestabilitu patrně v důsledku narušení terciární struktury (viz tab. 5.1, str. 90).

Ze studií rovněž vyplývá, že aktivační mechanismus může souviset i s oxidací samotné ASK1 (Nadeau *et al.*, 2007, 2009). Pomocí alkylace za nativních podmínek a hmotnostní spektrometrie jsme charakterizovali přístupnost jednotlivých cysteinů na povrchu proteinu redukované ASK1-TBD. Při klasickém protokolu proteomického

štěpení proteinu by však mohlo docházet ke spontánní tvorbě disulfidických vazeb, což by mohlo být pro analýzu zásadní. Proto analýza probíhala při nízkém pH a teplotě v podobném experimentálním uspořádání jako H/D výměna (viz kap. 4.3.5.1, str. 61). Alkylační experimenty odhalily, že Cys²⁰⁰, Cys²⁰⁶ a Cys²⁵⁰ jsou plně exponované na povrchu, zatímco Cys¹²⁰ byl kompletně nepřístupný alkylačnímu činidlu. Rezidua Cys¹⁸⁵ a jeden z párů Cys²²⁵ a Cys²²⁶ jsou exponované pouze částečně (viz obr. 5.13, str. 91).

Následně jsme zopakovali alkylaci ASK1-TBD za mírných podmínek oxidace, která odhalila tvorbu dvou intramolekulárních disulfidických můstků, konkrétně Cys²⁰⁰-Cys²⁰⁶ a Cys²²⁵-Cys²²⁶ (viz obr. 5.19-5.21, str. 105-107). V malé míře byly rovněž detekovány disulfidické můstky Cys¹⁸⁵-Cys²⁰⁰, Cys²⁵⁰-Cys²²⁵ nebo Cys²⁵⁰-Cys²²⁶. Význam tvorby těchto disulfidických vazeb v rámci ASK1-TBD však zbývá objasnit.

Při studiu vlivu oxidace ASK1-TBD na vazebnou afinitu vůči TRX1 nebylo možné použít katalyticky aktivní TRX1, který by mohl vyvolat její zpětnou redukci. Z toho důvodu jsme se rozhodli využít mutantní variantu TRX1 C35S. Nicméně experimenty sedimentační analýzy za neredukujících podmínek ukazovaly na jasnou tvorbu komplexu. To nás vedlo k myšlence, že může docházet k tvorbě intermolekulárního disulfidu mezi Cys³² TRX1 a cysteinem z ASK1-TBD. Tato hypotéza byla potvrzena provedením neredukující SDS-PAGE, při které byla jasně pozorována zóna odpovídající komplexu mezi oběma proteiny spojených kovaletní disulfidickou vazbou (viz obr. 5.18 B, str. 103). Hmotnostně-spektrometrická analýza označila, že v rámci ASK1-TBD se jedná o Cys²⁰⁰, což je i v souladu s jeho přístupností na povrchu (viz obr. 5.18 A, str. 103 a obr. 5.13, str. 91).

Proto jsme se oxidovaný stav ASK1-TBD pokusili dále charakterizovat pomocí měření časově rozlišené tryptofanové fluorescence. Pro tyto účely byly použity mutantní verze ASK1-TBD, které měly vnesené tryptofany na pozicích Phe²⁴² a Phe¹⁷⁵. Tyto mutace byly vybrány na základě prvotního teoretického modelu ASK1-TBD, ze kterého vyplývá proximita těchto reziduí vůči detekovaným disulfidickým můstkům. Tato měření zjistila změny v přístupnosti i flexibilitě Trp²⁴², které mohou reflektovat konformační změny na základě tvorby disulfidické vazby Cys²²⁵-Cys²²⁶ (viz tab. 5.6, obr. 5.22, str. 108-109).

V rámci bližší charakterizace komplexu mezi ASK1-TBD a TRX1 jsme využili techniky SAXS. Tato měření prokázala, že ASK1-TBD zaujímá v roztoku kompaktní a částečně asymetrický tvar (viz obr. 5.16, str. 98). Molekula komplexu sdílí velmi podobný tvar, avšak má protáhlejší objemnější část. Ze srovnání obou *ab initio* molekulárních obálek, vyplývá, že TRX1 interaguje s ASK1-TBD skrze rozsáhlé vazebné rozhraní bez dramatické změny struktury TBD domény. Lokální konformační změny nad rámec rozlišení však nemohou být vyloučeny. Strukturní rigidita ASK1-TBD je i v souladu s měřením CD spektroskopie, které neprokázalo významné změny v terciární struktuře proteinů při tvorbě komplexu (viz obr. 5.15, str. 96). Měření časově rozlišené tryptofanové fluorescence v okolí vnesených tryptofanů v sekvenci ASK1-TBD rovněž vypovídá o kompaktnosti a rigiditě této domény (viz tab. 5.3, str. 95). Měření CD spektroskopie ve vzdálené oblasti UV bylo užitečné pro získání odhadu sekundární struktury ASK1-TBD.

Získané poznatky nám umožnily upřesnit *ab initio* teoretický model komplexu ASK1-TBD:TRX1. Pomocí rigidního modelování jsme získali model, který je velmi konzistentní s experimentálními daty ($\chi = 0.78$, viz obr. 5.23, str. 110). Z modelu vyplývá, že vazebné místo thioredoxinu leží v C-terminální části ASK1-TBD, kde se nachází Cys²⁰⁰, Cys²⁰⁶, Cys²²⁵, Cys²²⁶ a Cys²⁵⁰. Vazebné rozhraní zahrnuje katalytické centrum thioredoxinu, včetně Trp³¹ a Cys³² a Cys²⁵⁰ z ASK1-TBD, který je rovněž zásadní pro interakci. Phe²⁴², který byl nahrazen tryptofanem a v jehož blízkosti dochází k tvorbě důležitého disulfidického můstku Cys²²⁵-Cys²²⁶, je rovněž součástí predikovaného vazebného povrchu.

Naše sekvence ASK1-TBD se na C-konci částečně překrývá s objasněnou strukturou centrální regulační oblasti (Weijman *et al.*, 2017), která je tvořena z převážné části kompaktní helikální strukturou v podobě TPR domény. Náš model toto uspořádání částečně predikuje, přestože v našem případě se jedná o hypotetickou strukturní konformaci získanou na základě dat s nízkým rozlišením.

Autoři studie Bunkoczi *et al.* pozorovali stabilní dimerizaci kinasové domény bez ohledu na přítomnost C-koncové CC-domény. Na druhé straně ASK1-TBD, centrální regulační oblast i úsek sekvence 88-941 (zahrnující kinasovou doménu, CRR a ASK1-TBD) se v roztoku nachází ve formě monomeru. Přestože tato pozorování nejsou plně v souladu s navrženým mechanismem aktivace, který zahrnuje homo-

oligomerizaci na N-konci proteinu, nemůžeme vyloučit i potenciální roli vazby faktorů TRAF a oligomerizaci v C-koncové části proteinu. Z toho je zřejmé, že pro celkový obraz mechanismu inhibice ASK1 thioredoxinem nám stále schází prostudovat vliv všech výše uvedených mechanismů současně. Nezbytným předpokladem pro pochopení této regulace je také vyřešení struktury ASK1-TBD na úrovni atomárního rozlišení.

6.2 Interakce mezi CaMKK2 a 14-3-3 γ

CaMKK2 patří k předním zástupcům CaM kinas, které vytváří komplikovanou signalizační kaskádu ovlivňující širokou škálu dějů, včetně genové transkripce nebo apoptosy (Swulius & Waxham, 2008). Biologické aspekty CaMKK2 dosahují ještě dále, protože je i důležitým aktivátorem AMPK, jíž se přisuzuje role při vývoji obezity. Dřívější studie isoformy CaMKK1 naznačují, že vazba proteinů 14-3-3 může přímo modulovat katalytickou aktivitu nebo stericky chránit regulační fosforylační místo Thr¹⁰⁸ před defosforylací (Davare *et al.*, 2004; Ichimura *et al.*, 2008). Rozdílné biochemické vlastnosti obou isoform označí, že i regulační mechanismus skrze vazbu proteinu 14-3-3 nemusí být jednotný. Na základě těchto skutečností bylo jedním z cílů této práce objasnění inhibičního mechanismu isoformy CaMKK2 pomocí charakterizace komplexu pCaMKK2:14-3-3 $\gamma\Delta$ C.

SAXS analýza prokázala, že komplex mezi 14-3-3 $\gamma\Delta$ C a pCaMKK2 S100 zaujímá protáhlou a flexibilní konformaci, ve které dochází ke kontaktům mezi kinasovou doménou a dimerem 14-3-3 mimo jeho vazebný kanál (viz obr. 5.28, str. 117 a obr. 5.29 A-B, str. 119). V důsledku značné flexibility komplexu jsme se rozhodli strukturu interpretovat souborem konformerů.

Z analýzy EOM vyplývá, že konformery nejsou náhodně zastoupeny a zaujímají kompaktnější tvar. Tento předpoklad dokládá i měření vazebné afinity mezi 14-3-3 a peptidem obsahujícího vazebný motiv Ser¹⁰⁰ ($K_D \sim 9\mu\text{M}$) (Psenakova *et al.*, 2018). Ve srovnání s intaktním proteinem, byla afinita téměř 10x nižší, což opět poukazuje na další interakční kontakty mimo vazebná místa. Přestože fosforylace C-koncového vazebného místa Ser⁵¹¹ je signifikantně nižší *in vivo* (Okuno *et al.*, 2001; Davare *et al.*, 2004) přítomnost tohoto motivu má významný vliv na celkovou stabilitu komplexu a konformační flexibilitu (viz obr. 5.26 B, str. 113; 5.28 C-D; tab. 5.7, str. 116). Snížená

flexibilita patrně vyplývá z imobilizace C-koncové oblasti CaMKK2 v důsledku vazby motivu do druhého vazebného žlábků dimeru 14-3-3 γ .

Aktivita CaMKK1 je regulována skrze fosforylaci Thr¹⁰⁸ (Thr¹⁴⁵ u CaMKK2) (Kitani *et al.*, 2001; Wayman *et al.*, 1997), která blokuje aktivaci substrátů CaMKI a CaMKIV. Z nedávné studie vyplývá, že fosforylace tohoto místa protřednictvím AMPK je spjata s negativní regulací autonomní aktivity, aniž by ovlivnila její kalmodulin-dependentní aktivitu. Fosforylace tohoto rezidua pravděpodobně vyvolává konformační změnu, při které dojde k protekci N-koncové regulační domény v důsledku kontaktu s autoinhibiční doménou na C-konci (Nakanishi *et al.*, 2017; Tokumitsu *et al.*, 2001). V souladu s tímto teoretickým mechanismem jsme pozorovali strukturní změny v okolí Trp¹⁴⁰ (Psenakova *et al.*, 2018) a rovněž zpomalenou defosforylaci Thr¹⁴⁵ i Ser⁴⁹⁵ při vazbě proteinu 14-3-3 (viz obr. 5.30, str. 121 a tab. 5.8, str. 122). Role proteinů 14-3-3 v regulaci CaMKK2 tedy spíše spočívá ve stabilizaci inaktivního stavu, než v přímé regulaci katalytické aktivity.

6.3 Interakce mezi CaMKK2 a Ca²⁺/CaM

Ze strukturních studií většiny zástupců CaMK (CaMKI, CaMKII i CaMKIV) vyplývá, že AID vychází ze spodní části kinasové domény mezi helixy α D a α E (viz obr. 5.33, str. 128), čímž ovlivňuje pozici helixu α D a konformaci aktivního centra (Goldberg *et al.*, 1996; Chao *et al.*, 2011; Rosenberg *et al.*, 2005). V některých případech bylo zaznamenáno, že AID přímo zasahuje do aktivního centra. Jakákoliv reorganizace aktivního centra je podstatou autoinhibičního mechanismu (Goldberg *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1994). Avšak C-koncový lalok CaMKK2 KD helix α D postrádá a rovněž délka sekvence AID je odlišná od CaMKI a CaMKII, což nás nabádá k představě rozdílné interakce mezi AID a kinasovou doménou (Kukimoto-Niino *et al.*, 2011a). Experimenty H/D výměny naznačují, že AID by mohl interagovat skrze povrch tvořený řetězcí β 4, β 5 a helixem α C, který se nachází na opačné straně kinasové domény než u jiných zástupců CaMK. Tyto oblasti vykazovaly při vazbě Ca²⁺/kalmodulinu zvýšenou míru deprotece především v kratších časových intervalech, ve kterých probíhá aktivace (viz. obr. 5.32, str. 127 a 5.34 str. 129). Tato

pozorování jsou v souladu s představou odlišné interakce mezi CaMKK2 KD a AID (Kukimoto-Niino *et al.*, 2011b; Osawa *et al.*, 1999; Tokumitsu *et al.*, 1999).

Na druhé straně byly nalezeny i oblasti CaMKK2 KD, které vykazovaly pomalejší kinetiku výměny v komplexu. Jedná se o helix αE a segmenty $\beta 6$ - $\beta 8$ a $\beta 1$ - $\beta 2$ (viz obr. 5.32–5.34, str. 127-129). Tyto oblasti se nachází v blízkosti ATP-vazebného místa a pozorované změny reflektují indukované konformační změny v důsledku vazby Ca^{2+} /kalmodulinu. Tato predikce je v souladu s dřívějšími studiemi aktivačního mechanismu, které na základě cílené mutagenese aminokyselin v blízkosti aktivního centra předpokládají, že uvolnění AID je doprovázeno reorganizací aktivního centra (O'Brien *et al.*, 2017). Rychlejší kinetika deuterace byla pozorována u unikátního motivu CaMKK2, RP insertu (viz obr. 5.32 a 5.34). Expozice tohoto vysoce flexibilního úseku po aktivaci vazbou kalmodulinu rovněž souvisí s jeho biologickou podstatou, která tkví v rozpoznávání cílových substrátů CaMKI a CaMKIV (Tokumitsu *et al.*, 1999).

Strukturní studie kinasy DAPK nabízí mechanismus aktivace založený na simultánní interakci kalmodulinu s CBD i s kinasovou doménou, při níž dochází ke snížené přístupnosti aktivního centra (de Diego *et al.*, 2010). Některé oblasti kinasové domény vykazovaly zvýšenou míru protekce i po 5 hodinách deuterace, kdy se systém nachází v dynamické rovnováze. Zvýšená protekce může být příčinou stabilizace prvků sekundární struktury anebo odrážet sníženou přístupnost okolnímu prostředí v důsledku interakce kinasové domény s AID s navázaným Ca^{2+} /kalmodulinem (Ca^{2+} /CaM-AID).

Analýza EOM získaných SAXS dat a meziatomové vzdálenosti z chemického zesíťení dokazují, že větší část molekul komplexu CaMKK2: Ca^{2+} /CaM zaujímá kompaktnější strukturu (viz obr. 5.31 E-F, str. 125 a tab. 5.9, str. 123). Tyto výsledky jsou konzistentní s naší hypotézou, že kinasová doména CaMKK2 přímo interaguje s Ca^{2+} /CaM-AID. Normalizovaný Kratkyho výnos (obr. 5.31 C) vypovídající o konformační flexibilitě molekul v roztoku, dokládá, že tato interakce je spíše transietní.

Model komplexu CaMKK2 KD: Ca^{2+} /CaM (viz obr. 5.35, str. 132) vytvořený na základě výsledků z chemického zesíťení a H/D výměny napovídá, že interakce mezi Ca^{2+} /CaM-AID a kinasovou doménou je zprostředkována skrze C-konec αE . V této

pozici by vazba kalmodulinu neměla blokovat aktivní místo, které se nachází na opačné straně kinasové domény. Model je konzistentní se všemi získanými spojeními, s výjimkou č. 4 (tab. 5.10, str. 131), který spojuje N-konec CBD s N-terminální doménou kalmodulinu. Toto neobvyklé strukturní uspořádání bylo zaznamenáno u peptidu CaMKK1 CBD s Ca^{2+} /kalmodulinem (Osawa *et al.*, 1999). Proto pozorování tohoto spojení naznačuje, že určitá část molekul interaguje i v opačné orientaci, než jak je patrné z modelu.

Z těchto výsledků je zřejmé, že kinasová doména hraje velmi důležitou roli jak při inhibičních tak i aktivačních mechanismech CaMKK2. Nicméně získané modely je nutné podpořit strukturními daty s vysokým rozlišením, na kterých se v současné době pracuje.

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo studium mechanismů regulace signálních proteinů ASK1 a CaMKK2 na základě biofyzikální a strukturní charakterizace diskutovaných komplexů. S použitím biochemických přístupů (rekombinantní exprese proteinů a mutagenese) a biofyzikálních metod (AUC, SAXS, časově rozlišená fluorescenční spektroskopie, hmotnostní spektrometrie) se nám podařilo strukturní podstatu regulačních mechanismů do jisté míry objasnit. V rámci těchto projektů bylo dosaženo následujících výsledků:

A) Interakce mezi proteinkinasou ASK1 a thioredoxinem

- ASK1 (88-302) je v roztoku monomerní a rigidní doména.
- ASK1 s thioredoxinem vytváří v roztoku stabilní ekvimolární komplex.
- Strukturní integrita katalytického motivu thioredoxinu ³¹WCGPC³⁵ je zásadní pro interakci s ASK1 kinasou, přičemž Cys³² a Trp³¹ jsou nezbytné pro udržení stability komplexu.
- Výsledky časově rozlišené fluorescence dokazují, že Trp³¹ je přímo zapojen do interakce s ASK1-TBD.
- Výsledky ze SAXS potvrzují, že thioredoxin interaguje s ASK1 skrze rozsáhlé vazebné rozhraní, aniž by indukoval výrazné konformační změny v její struktuře.
- Hlavním faktorem ovlivňujícím disociaci komplexu při oxidačním stresu je tvorba disulfidického můstku mezi Cys³² a Cys³⁵ aktivního centra.
- Cys²⁵⁰ je jediným cysteinem ASK1, který je přístupný na povrchu proteinu a má významný stabilizační avšak zatím nevysvětlitelný vliv na interakci s thioredoxinem v redukujícím prostředí.
- Alkylační studie za oxidujících podmínek prokázaly, že v rámci struktury ASK1 dochází k tvorbě nejméně dvou intramolekulárních disulfidických můstků Cys²⁰⁰-Cys²⁰⁶ a Cys²²⁵-Cys²²⁶. Cystein 200 je součástí vazebného rozhraní s thioredoxinem.
- Oxidace cysteinů ASK1 může způsobit lokální konformační změny v důležitých interakčních oblastech.

B) Interakce mezi CaMKK2 a 14-3-3 γ

- CaMKK2 (93-517) a její mutantní verze CaMKK2 S100 i CaMKK2 S100, 511 se nachází v roztoku ve formě monomeru.
- Sedimentační analýza potvrdila, že obě mutantní formy vytváří se 14-3-3 γ komplex s molární stechiometrií 1:2.
- Komplex mezi 14-3-3 γ a pCaMKK2 S100 zaujímá protáhlou a flexibilní konformaci, ve které dochází ke kontaktům mezi kinasovou doménou a dimerem 14-3-3 γ mimo vazebný kanál protein 14-3-3.
- Navzdory nižší fosforylaci C-koncového motivu (S511) *in vivo*, CaMKK2 obsahující tento motiv váže 14-3-3 γ s vyšší afinitou a struktura tohoto komplexu má v roztoku kompaktnější tvar patrně v důsledku stabilizačních interakcí s druhým vazebným žlábkem 14-3-3 γ .
- Pomalejší kinetika defosforylace PKA regulačních míst, Thr¹⁴⁵ a Ser⁴⁹⁵, naznačuje, že regulace CaMKK2 prostřednictvím proteinů 14-3-3 je založena na stabilizaci inaktivní konformace.

C) Interakce mezi CaMKK2 a Ca²⁺/kalmodulinem

- Kinasová doména CaMKK2 interaguje s AID skrze oblast v N-koncovém laloku tvořený řetězcem β 4, β 5 a helixem α C a oblastí zahrnující důležitý RP insert.
- Vazba Ca²⁺/kalmodulinu ovlivňuje několik oblastí v kinasové doméně, včetně několik úseků v blízkosti aktivního centra a aktivačního segmentu.
- SAXS a EOM analýza potvrdila, že téměř polovina molekul zaujímá v roztoku kompaktní tvar, ale že tato interakce je transientní.
- Model komplexu získaný na základě dat H/D výměny a chemického zesíťení předpokládá, že autoinhibiční mechanismus zprostředkovaný interakcí mezi kinasovou doménou a AID funguje na základě sterické zábrany RP insertu a ovlivnění struktury ATP-vazebného místa.

Výsledky byly publikovány v rámci třech odborných článků v magazínech *Journal of Biological Chemistry*, *FEBS Journal* a *Biochimica et Biophysica Acta*. Výsledky projektu zaměřeného na strukturní charakterizaci komplexu CaMKK2:Ca²⁺/CaM jsou v recenzním řízení.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Adams, J. A. (2001). *Chem. Rev.* **101**, 2271–2290.
- Aitken, A., Collinge, D. B., van Heusden, B. P. H., Isobe, T., Roseboom, P. H., Rosenfeld, G. & Soll, J. (1992). *Trends Biochem. Sci.* **17**, 498–501.
- Akamine, P., Madhusudan, null, Wu, J., Xuong, N.-H., Ten Eyck, L. F. & Taylor, S. S. (2003). *J. Mol. Biol.* **327**, 159–171.
- Alblova, M., Smidova, A., Docekal, V., Vesely, J., Herman, P., Obsilova, V. & Obsil, T. (2017). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E9811–E9820.
- Anderson, K. A., Means, R. L., Huang, Q. H., Kemp, B. E., Goldstein, E. G., Selbert, M. A., Edelman, A. M., Freneau, R. T. & Means, A. R. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 31880–31889.
- Anderson, K. A., Ribar, T. J., Lin, F., Noeldner, P. K., Green, M. F., Muehlbauer, M. J., Witters, L. A., Kemp, B. E. & Means, A. R. (2008). *Cell Metab.* **7**, 377–388.
- Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J. & Morán, F. (1993). *Protein Eng.* **6**, 383–390.
- Balmer, Y., Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.-P., Manieri, W., Schurmann, P., Droux, M. & Buchanan, B. B. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2642–2647.
- Bayley, P. M., Findlay, W. A. & Martin, S. R. (1996). *Protein Sci.* **5**, 1215–1228.
- Bernadó, P., Mylonas, E., Petoukhov, M. V., Blackledge, M. & Svergun, D. I. (2007). *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5656–5664.
- Berridge, M. J. (2002). *Cell Calcium.* **32**, 235–249.
- Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. (2000). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11–21.
- Bonneté, F., Finet, S. & Tardieu, A. (1999). *J. Cryst. Growth.* **196**, 403–414.
- Bootman, M. D., Lipp, P. & Berridge, M. J. (2001). *J. Cell Sci.* **114**, 2213–2222.
- Bunkoczi, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Müller, S., Sobott, F., Parker, S. A., Zhang, H., Min, W., Turk, B. E. & Knapp, S. (2007). *Struct. Lond. Engl.* 1993. **15**, 1215–1226.
- Burger, V. M., Nolasco, D. O. & Stultz, C. M. (2016). *J. Biol. Chem.* **291**, 6706–6713.
- Bustos, D. M. (2012). *Mol. Biosyst.* **8**, 178–184.
- Chang, C.-W., Cheong, M.-L., Chang, G.-D., Tsai, M.-S. & Chen, H. (2013). *Mol. Hum. Reprod.* **19**, 745–755.
- Chao, L. H., Stratton, M. M., Lee, I.-H., Rosenberg, O. S., Levitz, J., Mandell, D. J., Kortemme, T., Groves, J. T., Schulman, H. & Kuriyan, J. (2011). *Cell.* **146**, 732–745.
- Chatila, T., Anderson, K. A., Ho, N. & Means, A. R. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 21542–21548.

- Chawla, S. (1998). *Science*. **281**, 1505–1509.
- Chen, Z., Seimiya, H., Naito, M., Mashima, T., Kizaki, A., Dan, S., Imaizumi, M., Ichijo, H., Miyazono, K. & Tsuruo, T. (1999). *Oncogene*. **18**, 173–180.
- Clore, G. M., Qin, J. & Gronenborn, A. M. (1994).
- Cole, J. L., Lary, J. W., P. Moody, T. & Laue, T. M. (2008). *Methods in Cell Biology*, Vol. 84, pp. 143–179. Elsevier.
- Costenaro, L., Grossmann, J. G., Ebel, C. & Maxwell, A. (2005). *Structure*. **13**, 287–296.
- Dagher, R., Peng, S., Gioria, S., Fève, M., Zeniou, M., Zimmermann, M., Pigault, C., Haiech, J. & Kilhoffer, M.-C. (2011). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1813**, 1059–1067.
- Davare, M. A., Fortin, D. A., Saneyoshi, T., Nygaard, S., Kaech, S., Banker, G., Soderling, T. R. & Wayman, G. A. (2009). *J. Neurosci.* **29**, 9794–9808.
- Davare, M. A., Saneyoshi, T., Guire, E. S., Nygaard, S. C. & Soderling, T. R. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 52191–52199.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. (2007). *Oncogene*. **26**, 3279–3290.
- de Diego, I., Kuper, J., Bakalova, N., Kursula, P. & Wilmanns, M. (2010a). *Sci. Signal.* **3**, ra6–ra6.
- de Diego, I., Kuper, J., Bakalova, N., Kursula, P. & Wilmanns, M. (2010b). *Sci. Signal.* **3**, ra6–ra6.
- Dominguez, C., Boelens, R. & Bonvin, A. M. J. J. (2003). *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731–1737.
- Doniach, S. (2001). *Chem. Rev.* **101**, 1763–1778.
- Ellman, G. L. (1958). *Arch. Biochem. Biophys.* **74**, 443–450.
- Englander, S. W. & Kallenbach, N. R. (1983). *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521.
- Enslen, H., Sun, P., Brickey, D., Soderling, S. H., Klamo, E. & Soderling, T. R. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 15520–15527.
- Federspiel, J. D., Codreanu, S. G., Palubinsky, A. M., Winland, A. J., Betanzos, C. M., McLaughlin, B. & Liebler, D. C. (2016). *Mol. Cell. Proteomics*. **15**, 1947–1961.
- Fujii, K., Goldman, E. H., Park, H. R., Zhang, L., Chen, J. & Fu, H. (2004). *Oncogene*. **23**, 5099–5104.
- Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K. & Ichijo, H. (2007). *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8152–8163.
- Fujisawa, T., Takahashi, M., Tsukamoto, Y., Yamaguchi, N., Nakoji, M., Endo, M., Kodaira, H., Hayashi, Y., Nishitoh, H., Naguro, I., Homma, K. & Ichijo, H. (2016). *Hum. Mol. Genet.* **25**, 245–253.
- Ganguly, S., Gastel, J. A., Weller, J. L., Schwartz, C., Jaffe, H., Namboodiri, M. A. A., Coon, S. L., Hickman, A. B., Rollag, M., Obsil, T., Beauverger, P., Ferry, G., Boutin, J. A. & Klein, D. C. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 8083–8088.

- Gardino, A. K., Smerdon, S. J. & Yaffe, M. B. (2006). *Semin. Cancer Biol.* **16**, 173–182.
- Garzon, J. I., López-Blanco, J. R., Pons, C., Kovacs, J., Abagyan, R., Fernandez-Recio, J. & Chacon, P. (2009). *Bioinformatics.* **25**, 2544–2551.
- Geleziunas, R., Xu, W., Takeda, K., Ichijo, H. & Greene, W. C. (2001). *Nature.* **410**, 834–838.
- Gibbs, C. S. & Zoller, M. J. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 8923–8931.
- Giese, K. P., Fedorov, N. B., Filipkowski, R. K. & Silva, A. J. (1998). *Science.* **279**, 870–873.
- Glatter, O. (1977). *J. Appl. Crystallogr.* **10**, 415–421.
- Glatter, O., Kratky, O. (1982). Small angle x-ray scattering London ; New York: Academic Press.
- Goldberg, J., Nairn, A. C. & Kuriyan, J. (1996). *Cell.* **84**, 875–887.
- Goldman, E. H., Chen, L. & Fu, H. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 10442–10449.
- Graewert, M. A. & Svergun, D. I. (2013). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 748–754.
- Green, M. F., Scott, J. W., Steel, R., Oakhill, J. S., Kemp, B. E. & Means, A. R. (2011). *J. Biol. Chem.* **286**, 28066–28079.
- Gsponer, J., Christodoulou, J., Cavalli, A., Bui, J. M., Richter, B., Dobson, C. M. & Vendruscolo, M. (2008). *Struct. Lond. Engl. 1993.* **16**, 736–746.
- Guinier, A. (1939). *Ann. Phys.* **11**, 161–237.
- Hagopian, J. C., Kirtley, M. P., Stevenson, L. M., Gergis, R. M., Russo, A. A., Pavletich, N. P., Parsons, S. M. & Lew, J. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 275–280.
- Haribabu, B., Hook, S. S., Selbert, M. A., Goldstein, E. G., Tomhave, E. D., Edelman, A. M., Snyderman, R. & Means, A. R. (1995). *EMBO J.* **14**, 3679–3686.
- Hashemy, S. I. & Holmgren, A. (2008). *J. Biol. Chem.* **283**, 21890–21898.
- Hatai, T., Matsuzawa, A., Inoshita, S., Mochida, Y., Kuroda, T., Sakamaki, K., Kuida, K., Yonehara, S., Ichijo, H. & Takeda, K. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 26576–26581.
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G. & Hardie, D. G. (2005). *Cell Metab.* **2**, 9–19.
- Hayakawa, R., Hayakawa, T., Takeda, K. & Ichijo, H. (2012). *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.* **88**, 434–453.
- Hemmer, W., McGlone, M., Tsigelny, I. & Taylor, S. S. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 16946–16954.
- van Heusden, G. P. H. & Yde Steensma, H. (2006). *Yeast.* **23**, 159–171.
- Hoeflich, K. P. & Ikura, M. (2002). *Cell.* **108**, 739–742.

- Hoeflich, K. P., Yeh, W. C., Yao, Z., Mak, T. W. & Woodgett, J. R. (1999). *Oncogene*. **18**, 5814–5820.
- Hunter, T. (2002). *Keio J. Med.* **51**, 61–71.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. & Gotoh, Y. (1997). *Science*. **275**, 90–94.
- Ichimura, T., Taoka, M., Hozumi, Y., Goto, K. & Tokumitsu, H. (2008). *FEBS Lett.* **582**, 661–665.
- Ikura, M., Clore, G., Gronenborn, A., Zhu, G., Klee, C. & Bax, A. (1992). *Science*. **256**, 632–638.
- Ishida, T. & Kinoshita, K. (2007). *Nucleic Acids Res.* **35**, W460–W464.
- Johnson, L. N., Noble, M. E. & Owen, D. J. (1996). *Cell*. **85**, 149–158.
- Jones, D. T. (1999). *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202.
- Kallis, G. B. & Holmgren, A. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 10261–10265.
- Kaplan, A., Morquette, B., Kroner, A., Leong, S., Madwar, C., Sanz, R., Banerjee, S. L., Antel, J., Bisson, N., David, S. & Fournier, A. E. (2017). *Neuron*. **93**, 1082-1093.e5.
- Karas, M. & Hillenkamp, F. (1988). *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. (2005). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*. **1751**, 119–139.
- Kemp, B. E., Graves, D. J., Benjamini, E. & Krebs, E. G. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**, 4888–4894.
- Kennelly, P. J. & Krebs, E. G. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 15555–15558.
- Kim, A. H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T. F. & Chao, M. V. (2001). *Mol. Cell. Biol.* **21**, 893–901.
- Kirkpatrick, S., Gelatt, C. D. & Vecchi, M. P. (1983). *Science*. **220**, 671–680.
- Kitani, T., Okuno, S. & Fujisawa, H. (1997). *J. Biochem. (Tokyo)*. **122**, 243–250.
- Kitani, T., Okuno, S. & Fujisawa, H. (2001). *J. Biochem. (Tokyo)*. **130**, 515–525.
- Knighton, D. R., Zheng, J. H., Ten Eyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N. H., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1991). *Science*. **253**, 407–414.
- Knighton, D. R., Zheng, J., Teneyck, L. F., Ashford, V. A., Xuong, N.-H., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1993).
- Kobe, B. & Kemp, B. E. (1999). *Nature*. **402**, 373–376.
- Kukimoto-Niino, M., Yoshikawa, S., Takagi, T., Ohsawa, N., Tomabechi, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Suzuki, A., Lee, S., Yamauchi, T., Okada-Iwabuchi, M., Iwabuchi, M., Kadowaki, T., Minokoshi, Y. & Yokoyama, S. (2011). *J. Biol. Chem.* **286**, 22570–22579.
- Lamm, O. (1929). *Z. Für Phys. Chem.* **143A**,

- Lakowicz, J.R. (2006a). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* Boston, MA: Springer US.
- Laue, T. (1996). *Beckman Coulter Technical Report A-1821-A*.
- Lebowitz, J., Lewis, M. S. & Schuck, P. (2009). *Protein Sci.* **11**, 2067–2079.
- Lee, V. M.-Y., Goedert, M. & Trojanowski, J. Q. (2001). *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1121–1159.
- Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H. H., Honoré, B., Andersen, A. H., Walbum, E., Vandekerckhove, J. & Celis, J. E. (1993). *J. Mol. Biol.* **231**, 982–998.
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R. J., Fu, H. & Liddington, R. (1995). *Nature*. **376**, 191–194.
- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H. & Kyriakis, J. M. (2000). *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2198–2208.
- Liu, Q., Wilkins, B. J., Lee, Y. J., Ichijo, H. & Molkentin, J. D. (2006). *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3785–3797.
- Liu, Y. (2002). *Circ. Res.* **90**, 1259–1266.
- Madhusudan, Trafny, E. A., Xuong, N.-H., Adams, J. A., Eyck, L. F. T., Taylor, S. S. & Sowadski, J. M. (1994). *Protein Sci.* **3**, 176–187.
- Manning, G. (2002). *Science*. **298**, 1912–1934.
- Masters, S. C. & Fu, H. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 45193–45200.
- Masters, S. C., Pederson, K. J., Zhang, L., Barbieri, J. T. & Fu, H. (1999). *Biochemistry (Mosc.)*. **38**, 5216–5221.
- Matsushita, M. & Nairn, A. C. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 21473–21481.
- Matsushita, M. & Nairn, A. C. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 10086–10093.
- Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K. & Ichijo, H. (2005). *Nat. Immunol.* **6**, 587–592.
- McKinsey, T. A., Zhang, C. L., Lu, J. & Olson, E. N. (2000). *Nature*. **408**, 106–111.
- Meador, W., Means, A. & Quirocho, F. (1992). *Science*. **257**, 1251–1255.
- Mertens, H. D. T. & Svergun, D. I. (2010). *J. Struct. Biol.* **172**, 128–141.
- Miyakawa, K., Matsunaga, S., Kanou, K., Matsuzawa, A., Morishita, R., Kudoh, A., Shindo, K., Yokoyama, M., Sato, H., Kimura, H., Tamura, T., Yamamoto, N., Ichijo, H., Takaori-Kondo, A. & Ryo, A. (2015). *Nat. Commun.* **6**, 6945.
- Moore, B. W. & Perez, V. J. (1967). *Englewood Cliffs N. J. Prentice-Hall*.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. & Shaw, A. S. (1996). *Cell*. **84**, 889–897.
- Nadeau, P. J., Charette, S. J. & Landry, J. (2009). *Mol. Biol. Cell.* **20**, 3628–3637.

- Nadeau, P. J., Charette, S. J., Toledano, M. B. & Landry, J. (2007). *Mol. Biol. Cell.* **18**, 3903–3913.
- Nairn, A. C. & Greengard, P. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 7273–7281.
- Nakanishi, A., Hatano, N., Fujiwara, Y., Sha'ri, A., Takabatake, S., Akano, H., Kanayama, N., Magari, M., Nozaki, N. & Tokumitsu, H. (2017). *J. Biol. Chem.* **292**, 19804–19813.
- Nielsen, P. J. (1991). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* **1088**, 425–428.
- Nishitoh, H. (2002). *Genes Dev.* **16**, 1345–1355.
- Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J.-I. & Ichijo, H. (2005). *J. Biol. Chem.* **280**, 37033–37040.
- O'Brien, M. T., Oakhill, J. S., Ling, N. X. Y., Langendorf, C. G., Hoque, A., Dite, T. A., Means, A. R., Kemp, B. E. & Scott, J. W. (2017). *Sci. Rep.* **7**, 43264.
- Obsil, T., Ghirlando, R., Anderson, D. E., Hickman, A. B. & Dyda, F. (2003). *Biochemistry (Mosc.)*. **42**, 15264–15272.
- Obsil, T., Ghirlando, R., Klein, D. C., Ganguly, S. & Dyda, F. (2001). *Cell*. **105**, 257–267.
- Obsilova, V., Herman, P., Vecer, J., Sulc, M., Teisinger, J. & Obsil, T. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 4531–4540.
- Okazaki, T., Higuchi, M., Takeda, K., Iwatsuki-Horimoto, K., Kiso, M., Miyagishi, M., Yanai, H., Kato, A., Yoneyama, M., Fujita, T., Taniguchi, T., Kawaoka, Y., Ichijo, H. & Gotoh, Y. (2015). *Sci. Signal.* **8**, ra78.
- Okuno, S., Kitani, T. & Fujisawa, H. (1995). *J. Biochem. (Tokyo)*. **117**, 686–690.
- Okuno, S., Kitani, T. & Fujisawa, H. (2001). *J. Biochem. (Tokyo)*. **130**, 503–513.
- Osawa, M., Tokumitsu, H., Swindells, M. B., Kurihara, H., Orita, M., Shibamura, T., Furuya, T. & Ikura, M. (1999). *Nat. Struct. Biol.* **6**, 819–824.
- Ottmann, C., Marco, S., Jaspert, N., Marcon, C., Schauer, N., Weyand, M., Vandermeeren, C., Duby, G., Boutry, M., Wittinghofer, A., Rigaud, J.-L. & Oecking, C. (2007). *Mol. Cell*. **25**, 427–440.
- Papagrigoriou, E., Elkins, J., Arrowsmith, C., Zhao, Y., Debreczeni, E. J., Edwards, A., Weigelt, J., Doyle, D., von Delft, F., Turnbull, A. & Yang, X. (2005).
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. (2001). *Endocr. Rev.* **22**, 153–183.
- Pearson, R. B. & Kemp, B. E. (1991). *Methods Enzymol.* **200**, 62–81.
- Peng, Y.-H., Shiao, H.-Y., Tu, C.-H., Liu, P.-M., Hsu, J. T.-A., Amancha, P. K., Wu, J.-S., Coumar, M. S., Chen, C.-H., Wang, S.-Y., Lin, W.-H., Sun, H.-Y., Chao, Y.-S., Lyu, P.-C., Hsieh, H.-P. & Wu, S.-Y. (2013). *J. Med. Chem.* **56**, 3889–3903.
- Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D. T., Konarev, P. V. & Svergun, D. I. (2012a). *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 342–350.

- Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D. T., Konarev, P. V. & Svergun, D. I. (2012*b*). *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 342–350.
- Petrvalska, O., Kosek, D., Kukacka, Z., Tosner, Z., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilova, V. & Obsil, T. (2016). *J. Biol. Chem.* **291**, 20753–20765.
- Prickett, T. D., Zerlanko, B., Gartner, J. J., Parker, S. C. J., Dutton-Regester, K., Lin, J. C., Teer, J. K., Wei, X., Jiang, J., NISC Comparative Sequencing Program, Chen, G., Davies, M. A., Gershenwald, J. E., Robinson, W., Robinson, S., Hayward, N. K., Rosenberg, S. A., Margulies, E. H. & Samuels, Y. (2014). *J. Invest. Dermatol.* **134**, 452–460.
- Qin, J., Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1996). *Biochemistry (Mosc.)*. **35**, 7–13.
- Racioppi, L. & Means, A. R. (2012). *J. Biol. Chem.* **287**, 31658–31665.
- Rambo, R. P. (2015). *Methods in Enzymology*, Vol. 558, pp. 363–390. Elsevier.
- Ramteke, M. P., Shelke, P., Ramamoorthy, V., Somavarapu, A. K., Gautam, A. K. S., Nanaware, P. P., Karanam, S., Mukhopadhyay, S. & Venkatraman, P. (2014). *FEBS Lett.* **588**, 71–78.
- Receveur-Brechot, V. & Durand, D. (2012). *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 55–75.
- Rellos, P., Pike, A. C. W., Niesen, F. H., Salah, E., Lee, W. H., von Delft, F. & Knapp, S. (2010). *PLoS Biol.* **8**, e1000426.
- Ren, X., Bjoernstedt, M., Shen, B., Ericson, M. L. & Holmgren, A. (1993). *Biochemistry (Mosc.)*. **32**, 9701–9708.
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J. & Yaffe, M. B. (1999). *Mol. Cell.* **4**, 153–166.
- Rosenberg, O. S., Deindl, S., Sung, R.-J., Nairn, A. C. & Kuriyan, J. (2005). *Cell.* **123**, 849–860.
- Rosenquist, M. (2001). *PLANT Physiol.* **127**, 142–149.
- Rozbesky, D., Man, P., Kavan, D., Chmelik, J., Cerny, J., Bezouska, K. & Novak, P. (2012). *Anal. Chem.* **84**, 867–870.
- Rubio, M. P., Geraghty, K. M., Wong, B. H. C., Wood, N. T., Campbell, D. G., Morrice, N. & Mackintosh, C. (2004). *Biochem. J.* **379**, 395–408.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. & Ichijo, H. (1998). *EMBO J.* **17**, 2596–2606.
- Schachman, H. (1989). *Nature.* **341**, 259–260.
- Schauerte, J. A. & Gafni, A. (1989). *Biochemistry (Mosc.)*. **28**, 3948–3954.
- Schmidt, C. & Robinson, C. V. (2014). *FEBS J.* **281**, 1950–1964.
- Schuck, P. (2013). *Biophys. Rev.* **5**, 159–171.
- Schuck, P. (2016). Basic principles of analytical ultracentrifugation Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.

- Schuck, P. & Demeler, B. (1999). *Biophys. J.* **76**, 2288–2296.
- Schumacher, A. M., Schavocky, J. P., Velentza, A. V., Mirzoeva, S. & Watterson, D. M. (2004). *Biochemistry (Mosc.)*. **43**, 8116–8124.
- Scott, J. W., Park, E., Rodriguiz, R. M., Oakhill, J. S., Issa, S. M. A., O'Brien, M. T., Dite, T. A., Langendorf, C. G., Wetsel, W. C., Means, A. R. & Kemp, B. E. (2015). *Sci. Rep.* **5**.
- Sechi, S. & Chait, B. T. (1998). *Anal. Chem.* **70**, 5150–5158.
- Selbert, M. A., Anderson, K. A., Huang, Q. H., Goldstein, E. G., Means, A. R. & Edelman, A. M. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 17616–17621.
- Silhan, J., Obsilova, V., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J. & Obsil, T. (2004). *J. Biol. Chem.* **279**, 49113–49119.
- Silhan, J., Vacha, P., Strnadova, P., Vecer, J., Herman, P., Sulc, M., Teisinger, J., Obsilova, V. & Obsil, T. (2009). *J. Biol. Chem.* **284**, 19349–19360.
- Sinz, A. (2006). *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 663–682.
- Soderling, T. R. (1996). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1297**, 131–138.
- Soderling, T. R. (1999). *Trends Biochem. Sci.* **24**, 232–236.
- Stark, M. S., Woods, S. L., Gartside, M. G., Bonazzi, V. F., Dutton-Regester, K., Aoude, L. G., Chow, D., Sereduk, C., Niemi, N. M., Tang, N., Ellis, J. J., Reid, J., Zismann, V., Tyagi, S., Muzny, D., Newsham, I., Wu, Y., Palmer, J. M., Pollak, T., Youngkin, D., Brooks, B. R., Lanagan, C., Schmidt, C. W., Kobe, B., MacKeigan, J. P., Yin, H., Brown, K. M., Gibbs, R., Trent, J. & Hayward, N. K. (2011). *Nat. Genet.* **44**, 165–169.
- Studier, F. W. (2005). *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234.
- Svergun, D. (2002). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 654–660.
- Svergun, D. I. (1992). *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503.
- Svergun, D. I. (1999). *Biophys. J.* **76**, 2879–2886.
- Swulius, M. T. & Waxham, M. N. (2008). *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2637–2657.
- Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Kishida, S., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. & Ichijo, H. (2004). *EMBO Rep.* **5**, 161–166.
- Takeda, K., Shimozone, R., Noguchi, T., Umeda, T., Morimoto, Y., Naguro, I., Tobiume, K., Saitoh, M., Matsuzawa, A. & Ichijo, H. (2007). *J. Biol. Chem.* **282**, 7522–7531.
- Takemaru, K.-I., Fischer, V. & Li, F.-Q. (2009). *Cell Cycle Georget. Tex.* **8**, 210–213.
- Tan, S. (2001). *Protein Expr. Purif.* **21**, 224–234.

- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Furuita, K., Hayashi, K., Yanase, T., Yamaguchi, M., Nakashima, C., Purwestri, Y. A., Tamaki, S., Ogaki, Y., Shimada, C., Nakagawa, A., Kojima, C. & Shimamoto, K. (2011). *Nature*. **476**, 332–335.
- Tidow, H. & Nissen, P. (2013). *FEBS J.* **280**, 5551–5565.
- Tobiume, K., Saitoh, M. & Ichijo, H. (2002). *J. Cell. Physiol.* **191**, 95–104.
- Tokumitsu, H., Iwabu, M., Ishikawa, Y. & Kobayashi, R. (2001). *Biochemistry (Mosc.)*. **40**, 13925–13932.
- Tokumitsu, H., Muramatsu, M., Ikura, M. & Kobayashi, R. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 20090–20095.
- Tokumitsu, H., Takahashi, N., Eto, K., Yano, S., Soderling, T. R. & Muramatsu, M. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 15803–15810.
- Tokumitsu, H., Wayman, G. A., Muramatsu, M. & Soderling, T. R. (1997). *Biochemistry (Mosc.)*. **36**, 12823–12827.
- Tria, G., Mertens, H. D. T., Kachala, M. & Svergun, D. I. (2015). *IUCrj.* **2**, 207–217.
- Truong, A. B., Masters, S. C., Yang, H. & Fu, H. (2002). *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **49**, 321–325.
- Vecer, J. & Herman, P. (2011). *J. Fluoresc.* **21**, 873–881.
- Vivoli, M., Novak, H. R., Littlechild, J. A. & Harmer, N. J. (2014). *J. Vis. Exp.*
- Vogel, H. J., Lindahl, L. & Thulin, E. (1983). *FEBS Lett.* **157**, 241–246.
- Volkov, V. V. & Svergun, D. I. (2003). *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 860–864.
- Wales, T. E. & Engen, J. R. (2006). *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 158–170.
- Wang, B., Yang, H., Liu, Y. C., Jelinek, T., Zhang, L., Ruoslahti, E. & Fu, H. (1999). *Biochemistry (Mosc.)*. **38**, 12499–12504.
- Wang, W. & Shakes, D. C. (1996). *J. Mol. Evol.* **43**, 384–398.
- Watanabe, S., Okuno, S., Kitani, T. & Fujisawa, H. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 6903–6910.
- Waterman, M. J. F., Stavridi, E. S., Waterman, J. L. F. & Halazonetis, T. D. (1998). *Nat. Genet.* **19**, 175–178.
- Watson, W. H. (2004). *Toxicol. Sci.* **78**, 3–14.
- Watson, W. H., Pohl, J., Montfort, W. R., Stuchlik, O., Reed, M. S., Powis, G. & Jones, D. P. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 33408–33415.
- Wayman, G. A., Tokumitsu, H. & Soderling, T. R. (1997). *J. Biol. Chem.* **272**, 16073–16076.
- Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G. & Montfort, W. R. (1996). *Structure*. **4**, 735–751.

- Weijman, J. F., Kumar, A., Jamieson, S. A., King, C. M., Caradoc-Davies, T. T., Ledgerwood, E. C., Murphy, J. M. & Mace, P. D. (2017). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E2096–E2105.
- Whitmore, L. & Wallace, B. A. (2008). *Biopolymers*. **89**, 392–400.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. (1999). *Physiol. Rev.* **79**, 143–180.
- Wilker, E. W., Grant, R. A., Artim, S. C. & Yaffe, M. B. (2005). *J. Biol. Chem.* **280**, 18891–18898.
- Wilson, M. A. & Brunger, A. T. (2000). *J. Mol. Biol.* **301**, 1237–1256.
- Würtele, M., Jelich-Ottmann, C., Wittinghofer, A. & Oecking, C. (2003). *EMBO J.* **22**, 987–994.
- Xiao, B., Smerdon, S. J., Jones, D. H., Dodson, G. G., Soneji, Y., Aitken, A. & Gamblin, S. J. (1995). *Nature*. **376**, 188–191.
- Yaffe, M. B. (2002). *FEBS Lett.* **513**, 53–57.
- Yaffe, M. B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P. R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S. J., Smerdon, S. J. & Cantley, L. C. (1997). *Cell*. **91**, 961–971.
- Yamauchi, T. (2005). *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1342–1354.
- Yang, H.-Y., Wen, Y.-Y., Chen, C.-H., Lozano, G. & Lee, M.-H. (2003). *Mol. Cell. Biol.* **23**, 7096–7107.
- Yang, X., Lee, W. H., Sobott, F., Papagrigoriou, E., Robinson, C. V., Grossmann, J. G., Sundström, M., Doyle, D. A. & Elkins, J. M. (2006). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17237–17242.
- Young, M. M., Tang, N., Hempel, J. C., Oshiro, C. M., Taylor, E. W., Kuntz, I. D., Gibson, B. W. & Dollinger, G. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5802–5806.
- Zhang, R. (2004). *Circ. Res.* **94**, 1483–1491.

Internetové zdroje:

- 1) Program pro tvorbu obrázků proteinových struktur – PyMOL 1.7.4. Dostupný z URL: <http://www.pymol.org/> [10. 3. 2018]
- 2) Schéma postupu cílené mutagenese (obr. 4.1). Dostupné z URL: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/200523.pdf> [10. 4. 2018]
- 3) Metoda sedimentačních rychlostí - Analytická ultracentrifugace (obr. 4.3). Dostupný z URL: [http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-\(sv-auc\)/](http://www.coriolis-pharma.com/contract-analytical-services/analytical-ultracentrifugation-(sv-auc)/) [12. 4. 2018]
- 4) Fyzikálně-chemické parametry pro AUC analýzu. Dostupné z URL: <http://sednterp.unh.edu/> [12. 4. 2018]

- 5) Programy pro vyhodnocování dat získaných pomocí SAXS. Dostupné z URL:
<http://www.emblhamburg.de/biosaxs/software.html> [20. 3. 2018]
- 6) Program pro predikci sekundární struktury proteinů – PSIPRED v3.3. Dostupný z URL: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> [29. 3. 2018]
- 7) Program na porovnávání primární struktury proteinů – T-coffee. Dostupný z URL: <http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular/> [13. 4. 2018]
- 8) Program pro výpočet molárních extinkčních koeficientů – ProtParam tool. Dostupný z URL: <http://web.expasy.org/protparam/> [1. 4. 2018]
- 9) Obrázky struktur homobifunkčních činidel DSS a DSG. Dostupné z URL: <https://www.thermofisher.com/> [1. 4. 2018]

Příloha 1

Strukturní porovnání CaMKK1, CaMKK2 a PKA získané programem T-coffee. Červeně jsou vyznačena vazebná místa pro 14-3-3.

CaMKK1	1	MEGGPAVCCQDPRAELVERVANI-----DVTHLEE
CaMKK2	1	MSSCVSSQPSNRAAPQDELGGRGSSSSSESQKPCEALRGLSSLSIHLGMESFIVVT--E
PKA	1	MGNIAAA-----
CaMKK1	31	ADGGPE-PTRNGVDEPPRARFASVTEGSTSRLLFARPSLSRRKLSLOERPAGSYLE----
CaMKK2	58	CEFGCAVDLGLARDRPLEADG-QEVLPLITSG-SCARPHLSRRKLSLOERSQGGGLAAGGSL
PKA	8	-----KKGSEQESVKE-ELA----
CaMKK1	86	-----AQAGPYATGPAASHISPRAWRRPTTESHHVAISLAEDCVOLNOYKLOSEIGKGA
CaMKK2	116	DMNGRCICPSLPYSFVSSPQSSPRLPFRPTTESHHVSIINGMODCVOLNOYTLKDEIGKGS
PKA	22	-----K-----AKEDFLAKWE-----SEACNTAHLDOERIKTLGTGS
RP insert		
CaMKK1	139	YGVVRLAYNESEDHRYAMKVLSSKKLLIFQYGFPRRPPPRGSAAGGPAKCLLPLEERVYQ
CaMKK2	176	YGVVRLAYNENDNTYYAMKVLSSKKLLIFQAGFPRRPPPRGRPAPGGCIGRPIEQVYQ
PKA	55	EGRVMLVKHKETGNHYAMKILDKQKVMK-----LKQIEHTLN
CaMKK1	199	EIAILKKLDHVNNVVKLIEVLDDPAEDNLYVFDLIRKGPVME-VPCDKPFSEEOARLYLR
CaMKK2	236	EIAILKKLDHPNVVKLIEVLDDPNEDHLYMVFEVNVQGPVME-VETIKPLSEDOARFYFQ
PKA	92	EKRILQAVNFPFLVKLEFSFD--NSNLYMVMEVVPGEFSHERRGRFSEPHARFYAA
CaMKK1	258	DVILGLEYLHCQKIHRDIKPSNLLVGGDGHVKIADFGVSNQFEGNDAQLSSTAGTPAFM
CaMKK2	295	DVILGLEYLHYOKIHRDIKPSNLLVGGDGHVKIADFGVSNQFEGSDALLSNTVGTAPFM
PKA	150	QIVTFSLDLYLEIDQQYQVDFGFAKRVRIWT---CGTPEYL
CaMKK1	318	APEAISDSGQSFSGKALDVWATGVTLYCFVVGKCPFDDESIHALHRIKIKNEPVVFPPEEE
CaMKK2	355	APESLSETRKIFSGKALDVWATGVTLYCFVVGKCPFDDEIRIMCLHSKIKSQAIEFPDQFD
PKA	207	APEIILSKG---YNKAVDWALGVLYEMAAGYEPFADQPIQYKIVSGKVRFPESH--
CaMKK1	378	ISEELKDLILKMLDKNPETR-----IGVPDIKLHPWVTNGEEPLPSESEHCSVVEVTEE
CaMKK2	415	ISEDLKDLITERMLDKNPESR-----IVVPEIKLHPWVTNGAEPLPSEDENCILVEVTEE
PKA	262	FSSDLKDLIRNLLQVDLTKRFGNLKNGVNDIKNEKNFATTD-----
AID-CBD		
CaMKK1	433	EVVNSVRLIPSWTTVILVKSMRKRSFGNPFEPOAR-----REERSISAPGNLIV
CaMKK2	470	EVVNSVRLHIPSLATVILVKIMIRKRSFGNPFEPSR-----REERSISAPGNLIT
PKA	303	-----W---IATYQRKVEAPFIPKFPGPGDTSNFDDYEEELRVSSINEKC
CaMKK1	483	KEGFEGGKSPLE-----PG
CaMKK2	519	KKFTRECESLSELKEARQRRQPPGHRPAPRGGGGSALVRGSPCVESCWAPAGSPARMHP
PKA	345	GKEFS-----EF-----
CaMKK1	498	VQDEEAS--
CaMKK2	579	LRPEEAMEPE
PKA		-----

Příloha 2

Publikace: D. Kosek[†], **S. Kylarova[†]**, K. Psenakova, L. Rezabkova, P. Herman, J. Vecer, V. Obsilova, T. Obsil „Biophysical nad Structural Characterization of the Thioredoxin-Binding domain of Protein Kinase ASK1 and its Interaction with Reduced Thioredoxin.“ *Journal of Biological Chemistry* 279, 24463-24474 (2014)

Podíl autorky na publikaci: purifikace proteinů, měření CD, redukované a neredukující SDS gely, příprava vzorků na SAXS a AUC měření

Příloha 3

Publikace: S. Kylarova⁺, D. Kosek⁺, O. Petrvalska, K. Psenakova, P. Man, J. Vecer, P. Herman, V. Obsilova, T. Obsil „Cysteine residues mediate high-affinity binding of thioredoxin to ASK1.“ *FEBS Journal* 283, 3821-3838 (2016)

Podíl autorky na publikaci: purifikace proteinů, redukované a neredukující SDS gely, spektrofotometrické stanovení volných sulfhydrylových skupin, příprava vzorků pro AUC měření, hmotnostní spektrometrii a časově rozlišenou fluorescenci

Příloha 4

Publikace: K. Psenakova⁺, O. Petrvalska⁺, **S. Kylarova⁺**, D. Lentini Santo, D. Kalabova, P. Herman, V. Obsilova, T. Obsil V. Obsilova, T. Obsil „14-3-3 protein directly interacts with the kinase domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK2).“ *Biochimica et Biophysica Acta*. Přijato k tisku. (2018)

Podíl autorky na publikaci: purifikace proteinů, Phos-tag gely, příprava vzorků pro AUC měření, měření hmotností spektrometrie a SAXS

Příloha 5

Publikace: S. Kylarova, K. Psenakova, P. Herman, V. Obsilova, T. Obsil „CaMKK2 kinase domain interacts with the autoinhibitory region through the N-terminal lobe including the RP insert.“ V recenzním řízení.

Podíl autorky na publikaci: purifikace proteinů, příprava vzorků pro SAXS, měření H/D výměny i chemického zesíťení a podíl na vyhodnocování dat